With the compliments

MARIO CURZI

Ricerche morfologiche e sperimentali su un micromicete termofilo

(*ACREMONIELLA THERMOPHILA* CURZI)

IMPERIAL BUREAU OF MYCOLOGY
6 DEC. 1930

Estratto dal *Bollettino della R. Stazione di Patologia vegetale di Roma*
Anno X - Nuova Serie - 1930 (VIII)

FIRENZE
TIPOGRAFIA MARIANO RICCI
Via S. Gallo, 31
—
1930 (VIII)

MARIO CURZI

Ricerche morfologiche e sperimentali su un micromicete termofilo

(*ACREMONIELLA THERMOPHILA* Curzi)

Estratto dal *Bollettino della R. Stazione di Patologia vegetale di Roma*
Anno X - Nuova Serie - 1930 (VIII)

FIRENZE
TIPOGRAFIA MARIANO RICCI
Via S. Gallo, 31
—
1930 (VIII)

SOMMARIO.

I. — Generalità e scopo del lavoro.
II. — Ricerche morfologiche e sistematiche.
A. — Organi vegetativi di sviluppo e di conservazione.
B. — Organi vegetativi di riproduzione.
1. — Conidiofori.
2. — Sporificazione e conidi.
C. — Posizione sistematica e sinonimia.
III. — Ricerche fisiologiche e biologiche.
A. — Sviluppo culturale e variazione dei caratteri.
1. — Variazioni fluttuanti.
2. — Variazioni a salti alternanti.
3. — Variazioni a salti non o parzialmente reversibili.
a. — Rapporti e variazioni negli stipiti cloniali.
b. — Reversioni e discussione.
B. — Influenza della temperatura su lo sviluppo culturale e su la selezione degli stipiti.
C. — Diffusione ed esistenza del fungo in natura.
IV. — Conclusioni.

I. — Generalità e scopo del lavoro.

L'esistenza della maggior parte degli esseri viventi non è possibile oltre i 45° C. Anzi, nei metazoi il limite massimo di temperatura è ordinariamente compreso fra i 30° e i 40° C. e poche volte esso arriva ai 45° C. come in alcuni vermi e insetti acquatici viventi presso sorgenti termali [9]. Nei vegetali invece sono frequenti i casi di organismi che resistono a temperature molto superiori all'usuale, e sono i gruppi botanici inferiori che presentano diverse specie le quali possono vegetare e riprodursi normalmente a temperature piuttosto elevate.

Il Cohn [4] fin dal 1862 osservò nella sorgente di Karlsbad delle cianoficee del genere *Oscillaria* che vivevano nei punti ove la temperatura dell'acqua era di 59° C., e l'Hoppe-Seyler [15] nelle terme di Ischia, nel

1875, trovò pure delle alghe svilupparsi a 60° C. e non a temperature superiori.

Ma più che nelle alghe i veri organismi termofili li riscontriamo nei miceti e meglio ancora negli schizomiceti.

Dopo che il Miquel [24] nel 1879 isolò dalle acque della Senna un bacterio che poteva svilupparsi fino a 70° C., gli studii sugli schizomiceti termofili si sono moltiplicati e oggi si conoscono diverse specie di *Lactobacillus* Beij. che hanno l'ottimo di sviluppo fra i 40° e i 45° C., lo *Streptococcus thermophilus* Orla-Jens., che l'ha a 45° C., l'*Actinomyces thermodiastaticus* Bergey a 65° C., ed inoltre una quindicina di specie di *Bacillaceae* che hanno generalmente l'ottimo di sviluppo compreso fra i 55° e i 70° C. [1]. Tra questi il *Bacillus Losanitcki* Geog., isolato dall'acqua a 83° C. della sorgente termica di Vranje (Serbia), ha la temperatura ottima di 72°-73° C., la minima a 45° C. e la massima a 78° C. [11].

Questi microrganismi hanno poi una diffusione straordinaria; essi non si rinvengono soltanto nelle acque termali [11] [37] e nei terreni tropicali [12], ma anche nelle acque del mare, dei fiumi, delle cloache e delle varie sorgenti; nella terra, nella polvere, nella paglia, nel letame; nelle feci di diversi mammiferi, uccelli, anfibi e pesci; nel latte, nel formaggio, nel muco della bocca, e perfino su la neve caduta di fresco [19] [33] [30] [40].

L'isolamento di questi bacteri da substrati, in cui le condizioni di temperatura sono tali da non permettere il loro sviluppo, stanno a provare, oltre la grande diffusione di questi organismi, la resistenza che essi presentano alle temperature basse. Ma dove si sviluppano? Se alcune specie sono state isolate dalle acque termali non è detto che queste possano costituire l'*habitat* naturale più comune, perchè poche sono le sorgenti e limitate le specie isolate.

Questa diffusione è in relazione alla possibilità di potersi riprodurre e moltiplicare un po' ovunque.

Nell'intestino umano tali microrganismi si riscontrano costantemente, e secondo Tsiklinski [39] comparirebbero nel neonato poche ore dopo la nascita; il tubo digerente dell'uomo e degli animali potrebbe quindi costituire un comune ambiente di sviluppo, ma quando si pensa che questi microrganismi sono generalmente aerobici ed hanno una temperatura ottima superiore al calore animale, non può ritenersi con sicurezza una tale probabilità. Più che nella sostanza organica in fermentazione nell'intestino i bacteri termofili si sviluppano all'aperto, là dove vi è un fenomeno fermentativo o di decomposizione della sostanza organica con elevamento di temperatura. Infatti, essi si rinvengono costantemente nel letame e in tutti i fenomeni di decomposizione delle materie organiche accompagnati da autoriscaldamento, prendendo parte attiva a questi processi una volta ritenuti di natura prettamente chimica.

Su questi schizomiceti il Globig [12] richiamò l'attenzione degli studiosi fin dal 1887, facendo osservare che le ricerche che allora venivano fatte su tali organismi non dovevano considerarsi come oggetto di pura curiosità. Essi possono essere agenti di fermentazione di alcuni zuccheri o del latte e di decomposizione della cellulosa, agendo a temperature anche superiori a quella di coagulazione dell'albumina [19] [20] [21] [35].

Numerosi e importanti sono quindi gli schizomiceti amanti del calore mentre molto esiguo è il numero delle specie fungine termofile e per di più sono quasi tutte imperfettamente note.

I funghi conosciuti come termofili sono generalmente termotolleranti, potendo svilupparsi bene tanto a temperatura ordinaria quanto alle temperature biologiche elevate, ma fino a un massimo che generalmente non supera i 60° C. Così sono riportati fra i termofili varî miceti isolati da substrati animali come l'*Aspergillus fumigatus* Fres., il *Paecilomyces Variotii* Bainier [17] [36], e alcune *Mucoraceae* quali il *Mucor pusillus* Lindt, il *Rhizo-*

mucor parasiticus Luc. et Cost., la *Lichtheimia corymbifera* (Cohn) Vuill., ecc.

Soltanto fra gli ifomiceti troviamo delle specie veramente termofile le quali non si sviluppano alla temperatura ordinaria dell'ambiente, che possiamo fissare col Miehe [21] al disotto di 25° C.. Tali ifomiceti sono: L'*Acremonium lanuginosus* (Tsilinski) n. c.; la *Malbranchea pulchella* Sacc. et Penz.; il *Penicillium Dupontii* Gr. et M.; e l'*Acremoniella thermophila* Curzi.

Il primo non è stato più rinvenuto dacchè l'Autrice lo descrisse nel 1899 sotto il nome di *Thermomyces lanuginosus* Tsil. [38]; esso, in base ai caratteri dati è indubbiamente un *Acremonium* Link. e a tale genere per questo lo riporto. Il secondo venne studiato dal Miehe [21] [22] nel 1907 sotto il nome di *Thermoidium sulfureum* Miehe; il terzo, isolato dal letame in fermentazione dal Dupont, venne descritto nel 1911 da Griffon e Maublanc [13]; e l'ultimo è stato rinvenuto da vari autori e recentemente da me su una speciale alterazione del frumento soprariscaldato [6].

*
* *

Fra questi ifomiceti l'*Acremoniella thermophila*, è certamente il più importante e, secondo le ricerche da me fatte, è il più termofilo di tutti i funghi fin'oggi conosciuti, potendo svilupparsi anche a 70° C.

Nel gennaio ultimo scorso, dopo che fui trasferito presso questa Stazione, il Mason dell'*Imperial Bureau of Mycology* di Kew mi avvisava che il fungo che io avevo descritto in una « pseudocarie » delle cariossidi di frumento, era servito al Rege [31] nel 1927 sotto il nome di *Acremoniella* sp., per uno studio sull'azione dei funghi nella decomposizione della paglia. Dall'esame della coltura che mi venne inviata dal Bryerley, sotto il quale il Rege aveva lavorato nella stazione sperimentale di

Rothamsted, ho potuto constatare l'esatta corrispondenza dell'indicazione del Mason.

Il fatto poi che la *Malbranchea pulchella* Sacc. et Penz. e qualche altro micete termofilo erano stati descritti o riportati da alcuni microbiologi sotto nomi speciali, non affatto corrispondenti alla loro vera posizione sistematica, mi ha messo in sospetto che anche il mio fungo, oltre sotto il nome di *Acremoniella* sp., come ha fatto il Rege, il quale si è limitato a una determinazione generica impeccabilmente esatta, possa essere stato riportato sotto altri nomi generici appartenenti a famiglie di deuteromiceti molto diverse. E infatti, dallo spoglio della letteratura sulla flora micologica termofila che nell'ultimo cinquantennio ha interessato alcuni microbiologi, trovo che il fungo venne riscontrato per primo nel 1907 da Miehe [21] il quale l'isolò dal fieno riscaldato e lo riferì erroneamente al *Thermomyces lanuginosus* Tsil.

Nel 1911 lo stesso fungo, isolato dal Dupont dall'avena umida, posta in ambiente riscaldato a 50° C., venne studiato da Griffon e Maublanc [13], i quali lo trovarono corrispondente a quello riportato dal Miehe e lo riferirono al genere *Sepedonium* Link.

Da questa breve rassegna dei lavori dei vari autori che si sono occupati di questo fungo, risulta chiara la confusione che c'è nella denominazione e nella tassonomia della specie; questa confusione ha portato qualche autore a fare ricerche microbiologiche già fatte da altri con il medesimo ifomicete senza sapere che attraverso alla differente denominazione usata si nascondeva la stessa identità specifica.

Per precisare la posizione sistematica e alcuni speciali fenomeni di variazione che la specie presenta, ho intrapreso uno studio morfologico e biologico di questo ifomicete tanto diffuso in natura e certamente interessante per le sue speciali proprietà termofile e per il suo intervento nei fenomeni di autoriscaldamento della sostanza organica.

II. — Ricerche morfologiche e sistematiche.

A. — Organi vegetativi di sviluppo e di conservazione.

Il micelio del fungo è ordinariamente ialino, piuttosto uniforme, frequentemente e regolarmente settato con le ife riunite spesso a fasci funiculosi striscianti sul substrato nutritivo e talora elevati a guisa di sinnemi irregolari e varî. Quando è vecchio assume sovente una leggera colorazione verdastra la quale è più intensa nei substrati amidacei.

Nel micelio aereo predominano ife sottili, frequentemente ramificate, di 0,7-2 μ. di diametro, le quali raramente arrivano a misurare 2,5 μ. Le ife striscianti sul substrato sono generalmente più grosse e diritte, poco ramificate ed hanno un calibro medio di 2-2,5 μ. e qualche volta anche di 3 μ.

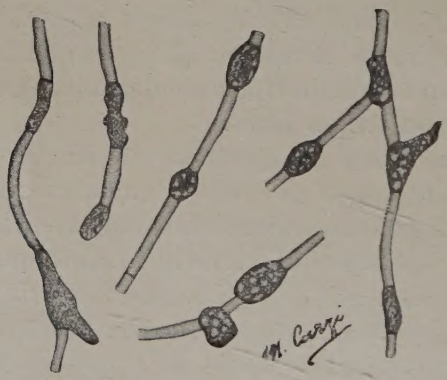

Fig. 1. — Cellarioli, × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

Tanto nel micelio aereo quanto in quello strisciante non ho mai osservato, nelle condizioni ordinarie, veri organi vegetativi di conservazione. Soltanto nelle colture su terreni molto ricchi di principi idrocarbonati e in quelle sviluppatesi a temperatura elevata, specialmente fra i 60°-70° C., le ife presentano dei rigonfiamenti in-

tercalari e meno frequentemente terminali, globosi, irregolari e ripieni di protoplasma granuloso con sostanze di riserva (grassi, glicogeno).

Questi rigonfiamenti costituiscono degli elementi vegetativi a parete sottile, la quale si conserva tale in tutto il periodo di evoluzione della cellula, coincidente generalmente con quello delle cellule ifali ordinarie, e non possono per questo essere considerati come clamidospore o come uno stadio iniziale di questi tipici organi di conservazione (Fig. 1). Si formano per una semplice concentrazione protoplasmatica, e con tutta probabilità nelle colture sviluppatesi ad alta temperatura, hanno anche lo scopo di meglio proteggere il protoplasma dal disseccamento, dato che in questo caso sono le ife striscianti superficiali che hanno un maggior numero di cellule ingrossate.

Questi elementi vegetativi che non hanno la parete ispessita come le clamidospore, e che sono poco differenziati dalle cellule ordinarie, con una funzione conservatrice particolare o limitata, come altri elementi simili che si riscontrano frequentemente nel micelio di diversi funghi, credo opportuno distinguerli con un nome speciale, chiamandoli *cellarioli* (dal latino *cellariolum* = piccola cella dispensa), con un nome cioè che possa ben indicare le loro caratteristiche di piccoli magazzini di riserva e di conservazione del protoplasma, mentre chiamo *ificellarioli* (lat. *hyphicellariola*) una serie continua di tali cellule costituenti nel loro insieme le « ife torulose » o il « micelio di riserva » di diversi autori (Fig. 2).

Nelle colture su mezzi liquidi, come nelle soluzioni nutritive a base di peptone e di vari carboidrati, sono molto frequenti dei rigonfiamenti intercalari, fialiformi, o globosi, aventi dapprima il protoplasma vaculoso, e poi tutta la parte centrale occupata generalmente da un grande vacuolo avvolto da un sottile strato di protoplasma aderente alla parete. Anche all'estremità delle ife si trovano spesso dei rigonfiamenti simili, i quali per certi

stipiti del fungo coltivati su substrati liquidi, come nelle soluzioni di peptone e saccarosio, assumono delle dimensioni molto grandi (Fig. 4).

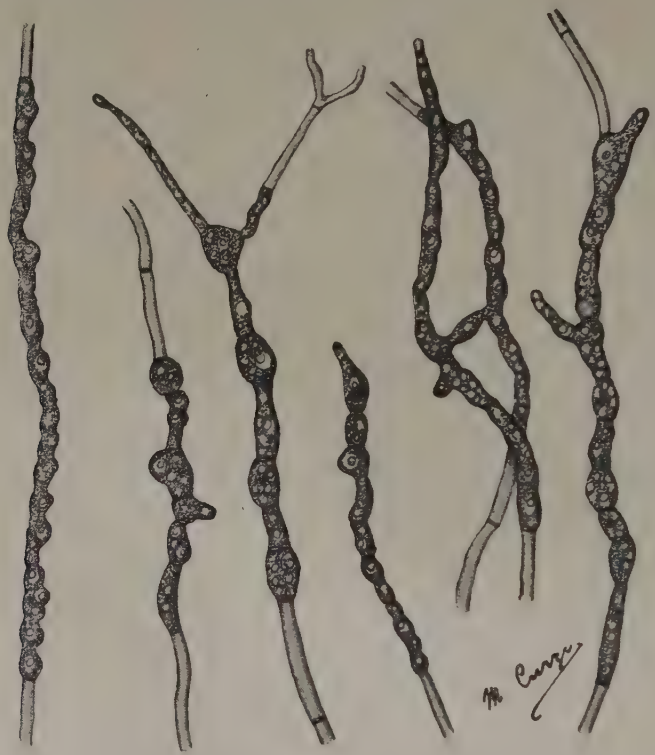

Fig. 2. — Ificellarioli, × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

Questi elementi, i quali sono molto rari nei terreni solidi, non hanno alcuna funzione conservatrice e sono caratterizzati soltanto da una elevata pressione osmotica sviluppata dal succo dei vacuoli. Essi possono derivare da cellule ifali ordinarie o da giovani conidî, oppure anche da cellarioli e riguardano sempre cellule vegetative anormali, in via di degenerazione; non si formano come i cellarioli per accumulo di protoplasma, ma per aumento di volume dei vacuoli e spesso di un unico vacuolo cen-

trale che spinge il protoplasma contro la parete e lo distende in un sottilissimo strato fino a che l'elasticità sua e della membrana faccia equilibrio alla pressione interna. Per la lacerazione della parete o meglio per una modificazione chimica delle sostanze osmoticamente at-

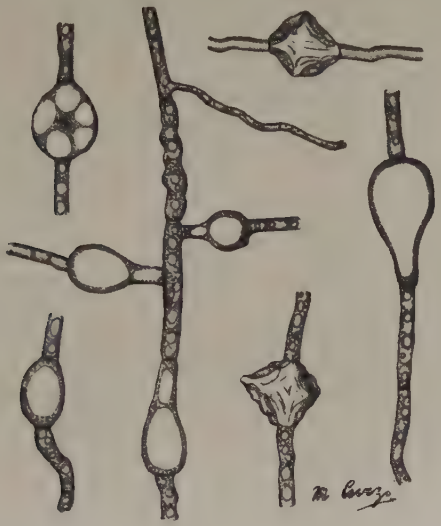

Fig. 3. — Oidalee intercalari, × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

tive, tali cellule perdono facilmente la loro turgescenza, si affloscianò e muoiono presentandosi come vesciche sgonfiate con la parete tutta pieghettata (Figg. 3 e 4).

Queste cellule turgescenti chiamate « swollen celles »(1) da alcuni autori anglo-sassoni, che le hanno riscontrate in funghi diversi, ricordano spesso le forme di involuzione delle cellule bacteriche, rigonfiate e ingrossate per il processo dalla *plasmoptisi* [14] il quale è stato ripor-

(1) Sotto questa denominazione sono stati indicati però anche i cellarioli globosi.

tato anche nei funghi dal Petri [27]. Esse non hanno un termine proprio, adatto alla nomenclatura botanica internazionale, e perciò credo bene denominarle *oidalee* (dal greco οἰδαλέος = gonfio), cioè con una parola che ben si presta a indicare nei funghi tutti gli elementi cellulari eccessivamente rigonfi e che presentano la parete non ispessita e l'interno occupato generalmente da grandi vacuoli.

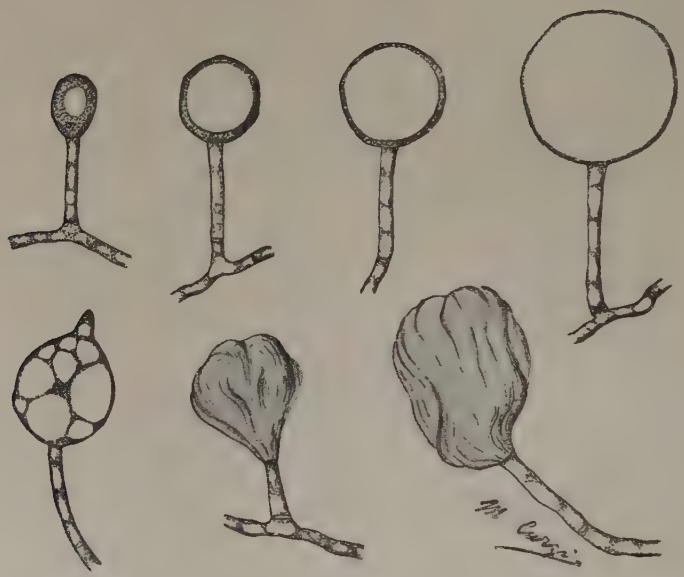

Fig. 4. — Oidalee terminali, × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

In questo ifomicete e in molti altri funghi, e particolarmente nel *Fusarium Moronei* Curzi, ho potuto constatare che le oidalee sono frequenti nelle colture su terreni liquidi e solidi molto ricchi o su quelli ordinari ai quali vengono aggiunte sostanze tossiche, cioè in substrati nei quali fra le cellule del fungo e l'ambiente non possono esserci condizioni favorevoli ad uno scambio osmotico normale.

*
* *

La ramificazione delle ife di questo fungo è talora simpodiale, ma il più delle volte è monopodiale e opposta: nel punto opposto a quello ove si sviluppa una ramificazione o un conidioforo, si ha spesso un altro conidioforo, o un'altra ramificazione oppure anche un leggero ingrossamento (Figg. 5 e 6).

Le ramificazioni dicotomiche si osservano spesso nelle ife miceliche dopo una cellula ingrossata a fiala oppure qualche volta su brevi rami fruttiferi portanti due sporofori (Fig. 6, *d*).

B. — Organi vegetativi di riproduzione.

Lo stadio conidico è l'unico mezzo di riproduzione conosciuto di questo fungo, e per questo, gli organi di riproduzione che dobbiamo considerare, sono i conidiofori e i conidi.

1. — Conidiofori.

I conidiofori sono brevi, generalmente perpendicolari all'ifa generatrice, più o meno sviluppati, ma che usualmente misurano 10-18 μ. di lunghezza. Tali organi non sono portati da ife speciali; qualunque ifa del fungo può produrli lateralmente, tanto nel micelio aereo quanto in quello sommerso. Sono rigonfiati nel mezzo e presentano verso la base un setto che li separa dall'ifa generatrice.

Una singolare proprietà di questo fungo è data dalla sporificazione delle ife sommerse con la produzione di sporofori e spore nell'interno del substrato, come avevo già osservato in natura nell'interno delle cariossidi di frumento. In queste condizioni i conidiofori sono un po' diversi di quelli che normalmente si sviluppano nel micelio aereo; non sono rigonfiati, hanno il medesimo diametro delle ife ed una lunghezza molto varia: o sono

brevissimi quasi come tante piccole sporgenze oppure sono invece abbastanza lunghi, con qualche setto intermedio e spesso colorati in olivaceo, specialmente nella

Fig. 5. — Fruttificazione tipica, × 980 (C. 1. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

parte superiore. Talora presentano anche un leggero spessimento fino al setto e la medesima colorazione del conidio (Fig. 6, *c*).

2. — Sporificazione e conidî.

Il conidioforo che origina il conidio si presenta dapprima come una breve ramificazione dell' ifa, di diametro uniforme; a questo brevissimo periodo iniziale, in cui il conidioforo non è affatto differenziato dall' ifa generatrice, segue un secondo periodo in cui, raggiunta la sua lunghezza, il conidioforo si ingrossa leggermente nel mezzo, aumentando il suo volume e il suo contenuto protoplasmatico finemente granuloso; questo è il periodo di maturazione e di preparazione del conidioforo alla formazione del conidio che io chiamerei *fase di presporificazione*. A questo segue un terzo periodo che si inizia con la comparsa all'apice del conidioforo di un leggero rigonfiamento che rappresenta lo stadio iniziale della formazione della spora (*fase di formazione*). Questo rigonfiamento apicale si ingrossa e si arrotonda a spese del protoplasma del conidioforo, il quale si vuota e viene separato dall'ifa generatrice a mezzo di un setto basale. Intanto il giovane conidio, raggiunto il suo massimo volume, appare sferico con la parete ialina, sottile, e il contenuto finemente granuloso; esso, terminato l'ingrossamento, ossia alla fine della fase di formazione, si separa dal conidioforo e inizia il periodo di maturazione, accompagnato evidentemente da una leggera concentrazione del protoplasma.

Tale periodo della sporificazione che costituisce la *fase di maturazione* delle spore, è caratterizzato da tre fenomeni; e cioè: dalla comparsa del colore, dall'ispessimento della parete e dalla formazione dell'esosporio.

Il primo sintomo percettibile di maturazione del conidio si ha con la comparsa di una leggerissima colorazione clorina, che poi tende a seconda dei substrati e degli stipiti del fungo, al verde-pistacchio, o al verde-porro, oppure anche al verde-rame per terminare poi, nei conidi completamente maturi, nel castaneo intenso, o nell'olivaceo o talora nel nero-azzurro.

Fig. 6. — Fruttificazioni atipiche e varie: *a* e *b*, ramificazioni miceliche e conidiofori opposti; *c*, ifa fruttifera sommersa nel substrato; *d*, ifa fruttifera con alcuni conidiofori semi composti; *e*, conidio con involucro eccessivamente rigonfiato; *f*, conidio maturo con l'involucro lacero, × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

Il colore dei conidî è molto variabile e da esso dipende la colorazione delle colonie del fungo, che come vedremo in seguito, è molto diversa sul medesimo substrato nutritivo.

La parete, all'inizio sottilissima e ialina, si ispessisce un po', colorandosi più o meno intensamente; essa rimane però sempre liscia e uniforme.

Quello che più merita di essere rilevato nella struttura dei conidî è la formazione di un rivestimento esterno, costituito di una sostanza mucillaginosa, che forma attorno alla parete uno strato uniforme dapprima ialino e attaccaticcio, per cui le spore aderiscono facilmente le une alle altre, e poi bruno e grinzoso, assumendo un aspetto reticolato non per variazione dello spessore, il quale resta pressochè uniforme, ma per contrazione a causa del disseccamento e della diminuzione di volume. Soltanto in condizioni speciali, come nelle soluzioni nutritive di peptone e lattosio, tale involucro appare irregolarmente ispessito, con rilievi prominenti ialini i quali però hanno tutta l'apparenza di incrostazioni cristalline, di provenienza esterna, casualmente aderenti all' esosporio.

La struttura dell'involucro esterno dei conidî, che costituisce l'esosporio, appare più nitida ed evidente, trattando i conidî con una soluzione di acido solforico diluito o di potassa caustica. Quando non è tanto secco, in acqua e alcool, si distacca nettamente dalla parete (Fig. 6, *d, e*).

Talora si osservano due conidî, e qualche volta anche tre contenuti in un unico involucro per essersi sviluppati vicini e per aver confuso in un'unica grande goccia i loro rivestimenti mucillaginosi, i quali disseccandosi, formano attorno ai due o tre conidî un rivestimento unico, generalmente liscio e uniforme, da dare a prima vista l'illusione di spore endogene (Fig. 7).

L'involucro si scioglie in gran parte nell'acqua di Javelle preparata di fresco e si colora in rosa col rosso di

Rutenio come le sostanze pectiche, mentre non si colora con i reattivi iodici e non presenta le reazioni microchimiche delle sostanze proteiche. Esso è della medesima natura dell'involucro esterno delle spore di *Scleroderma ambiguum* Petri e di qualche altro gasteromicete [26] e delle incrostazioni riscontrate su le ife miceliche dello *Stereum purpureum* Pers. dal Münch [25] e del *Cycloconium oleaginum* Cast. dal Petri [27].

Fig. 7. — Conidî aggregati con involucro in comune, × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

Come si forma questo esosporio non mi è stato possibile stabilire; ma più che alla trasudazione di sostanze attraverso alla parete a me sembra più probabile che esso si formi per trasformazione della parte esterna della parete mentre nell'interno avverrebbe la deposizione di nuovi strati. La costituzione dell'esosporio avvalora questa ipotesi in quanto che le sostanze pectiche derivano secondo alcuni dalla trasformazione delle emicellulose, e altre simili sostanze, le quali, stando alle ricerche di Meigen e Spreng, von Hesseland ed altri, sarebbero, oltre alla chitina, i principali costituenti delle pareti delle ife fungine.

Le spore poste in acqua o in soluzioni nutritive germinano facilmente quando la temperatura dell'ambiente non è inferiore ai 30° C. e non superiore ai 60° C. ed anche 70° C. a seconda degli stipiti e delle condizioni ambientali (Fig. 8).

Nelle temperature prossime al minimo la germinazione delle spore avviene generalmente con l'emissione di un solo tubo germinativo, ma in quelle superiori si hanno sovente due e più tubi germinativi e il micelio che ne deriva è sempre più ramificato di quello che si sviluppa nelle temperature inferiori.

C. — Posizione sistematica e sinonimia.

L'ifomicete qui descritto, per i caratteri degli organi vegetativi di riproduzione rientra senza dubbio nelle *Dematiaceae Phaeosporeae Monotosporeae,* ed è immancabilmente una specie del genere *Acremoniella* Sacc. come dal Rege è stato studiato [31] e da me descritto [6]. La morfologia specifica poi è così caratteristica e distinta da quella di tutte le altre specie di *Acremoniella* conosciute da non lasciare alcun dubbio sulla sua specificità distinta.

Il Rege [31], riportando il fungo con la semplice denominazione generica di *Acremoniella* sp., aggiunge che la specie: « resembles most closely *A. velutina* (Fuck.) except in the shape of the spores ». Tale rassomiglianza è basata però su una semplice corrispondenza dei dati micrometrici dei conidî, che non vuol significare nulla di fronte alle caratteristiche morfologiche e biologiche che distinguono le due specie. L'*A. velutina* venne descritta su corteccia di carpino rinvenuta all'aperto in un paese dell'Europa settentrionale, con « *Conidia ovoidea v. obovata, atra, pellucida* », e bastano soltanto questi caratteri diagnostici per differenziare nettamente la specie fucheliana dall'*A. Thermophila* la quale ha bisogno per svilupparsi di un certo grado di temperatura ed ha « *conidiis globosis, fuligineis v. castaneis, episporio crassiuscolo rugoso subreticulato* » [6].

Soltanto l'*A. Perinii* Poll. [29] si avvicina a questa specie dalla quale si differenzia però, oltre che per la

morfologia speciale delle fruttificazioni, anche per alcune caratteristiche biologiche. Il mio fungo al pari di altri microrganismi veramente termofili, non è patogeno sugli animali e vane sono riuscite sempre le inoculazioni su gli animali da laboratorio, l'*A. Perinii* invece è patogena, e come gli altri miceti parassiti degli animali, è semplicemente una specie termotollerante; essa si sviluppa bene a 25° C. come a 50° C. ed ha il massimo di sviluppo a 55° C.

Fig. 8. — Conidî di maturazione varia in germinazione in acqua leggermente zuccherata alla temperatura di 40° C., × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

Come ho sopra accennato l'ifomicete era stato segnalato da altri autori sotto nomi generici errati e tali che anche il più esperto micologo l'avrebbe descritto come nuovo se il caso non l'avesse condotto a constatare la sinonimia di nomi specifici riguardanti la stessa specie in gruppi di ifomiceti tanto diversi. Esso è stato infatti

riferito dal Miehe [21] al *Termomyces lanuginosus* Tsil. e riportato da Griffon e Maublanc [13] al genere *Sepedonium*.

Non ho potuto stabilire l'identità del mio fungo con quello di Miehe e di Griffon e Maublanc in base all'esame del materiale che non sono riuscito ad avere nemmeno dal Maublanc al quale l' ho richiesto; ma ho potuto riscontrare una corrispondenza perfetta di caratteri oltre che attraverso alle descrizioni e illustrazioni di questi autori, anche per aver isolato ripetutamente il medesimo fungo da foglie, paglia e semi di cereali provenienti da mucchi riscaldati e posti in termostato a 40°-50° C., proprio come indica il Miehe nel suo lavoro originale [21].

Il *Thermomyces lanuginosus* Tsil. è una mucedinea del genere *Acremonium* con conidî lisci, sferici o globoso-ellissoidei di appena 2,7-3 μ. di dimensioni, e che io credo opportuno chiamare *Acremonium lanuginosus* (Tsil.) n. c., non potendo costituire lo sviluppo ad alta temperatura una caratteristica generica apprezzabile. Tale fungo inoltre ha un minimo di sviluppo a 38° C. e, pure per questo, non può essere considerato come un supposto stadio giovanile dell'ifomicete studiato dal Miehe il quale si sviluppa a 30° C. La differenza nei due termini di temperatura minima di sviluppo è assai sensibile e non può non distinguere due funghi diversi dato che il *minimum*, al contrario del *maximum* rimane pressochè costante ed è sempre quello tanto negli stipiti del fungo che non si sviluppano oltre i 55° o i 60° C., quanto negli altri che si sviluppano fino a 68°-70° C.

Griffon e Maublanc [13] mettono in dubbio il riferimento di Miehe e, considerando un *Thermomyces lanuginosus* Miehe, con un punto interrogativo, riportano il fungo sotto il nome di *Sepedonium lanuginosus* (Miehe) Gr. et M. Questi due autori hanno creduto di trovarsi di fronte a un vero *Sepedonium*, più che altro perchè tale genere comprende — come essi scrivono — « un certain nombre de formes saprophytes qu'on rencontre no-

tanment sur le fumier, sur les dejections d'animaux ». Basta dare uno sguardo a una coltura del fungo su substrati amilacei per convincersi subito della sua posizione sistematica fra le demaziacee e non fra le mucedinee. L'esame microscopico poi rivela subito il colore delle spore, non semplicemente « *pallide umbrine* » come gli autori francesi le riportano, ma fuliginee e castanee come la gran parte delle specie di *Acremoniella* oggi conosciute.

I conidî di questo fungo non sono mai colorati in giallo o aranciato e non presentano in nessuna condizione, la echinulatura propria del genere *Sepedonium,* il quale è descritto con « *Conidia muriculata, hyalina v. laete colorata* »; la parete del conidio come abbiamo visto è e rimane sempre liscia e uniforme, mentre la rugosità è dovuta soltanto al disseccamento e alla contrazione del rivestimento esterno che funziona da esosporio, nell'ultimo periodo di maturazione del conidio.

Ma oltre che per i conidî anche per il modo di fruttificare il fungo si distingue nettamente dai *Sepedonium;* in queste mucedinee le ife fruttifere sono ramose e variamente ramificate con più rami conidiali, mentre nell'*A. thermophila* l'ifa fruttifera è ridotta semplicemente allo sporoforo, portato non da ife speciali, ma da qualunque ifa del fungo, anche da quelle sommerse nel substrato nutritivo.

*
* *

Dopo la dettagliata discussione sulla posizione sistematica di questo ifomicete, non mi sembra che possano esserci delle obbiezioni per il suo riferimento generico. Ma deve esso conservare il nome di *Acremoniella thermophila* oppure no, per la priorità del *Thermomyces lanuginosus* o del *Sepedonium lanuginosus?*

Se il microbiologo tedesco avesse descritto un *Thermomyces lanuginosus* Miehe, evidentemente la giusta denominazione della specie dovrebbe oggi essere *Acremo-*

niella lanuginosa (Miehe) n. c., ma dato che il Miehe parla soltanto di *Thermomyces lanuginosus* Tsilinski, col quale il suo fungo non ha nulla a che vedere, tale priorità non può sussistere. Anche il nome di *Sepedonium lanuginosus* (Miehe) Gr. et M. non può a mio avviso vantare la sua priorità, non rappresentando esso un nome nuovo, indispensabile per ben identificare il fungo di Miehe, ma una semplice correzione tassonomica, non esatta, che è gravata anche dall'incertezza espressa da Griffon e Maublanc, i quali, pur considerando la specie di Tsilinski « une espèce insuffisamment décrite et douteuse » non sanno con precisione se debbono considerare nettamente distinti i due funghi di Tsilinski e di Miehe, e per questo, riportando il *Sepedonium lanuginosus* (Miehe) Gr. et M., indicano in sinonimia : « *Thermomyces lanuginosus* Miehe, an *Tsilinski?* ».

Per le ragioni qui espresse si deve conservare a questo ifomicete il nome di *Acremoniella thermophila,* il quale, oltre a indicare la più esatta posizione sistematica del fungo e le sue speciali proprietà biologiche, non può essere causa di confusione con l'*Acremonium lanuginosus* (Tsilinski) n. c.

La sinonimia della specie viene quindi ad essere la seguente :

Acremoniella thermophila Curzi (1929) ;
Thermomyces lanuginosus Miehe non Tsil. (1907) ;
Sepedonium lanuginosus (Miehe) Gr. et M. (1911) ;
Acremoniella sp. Rege (1927).

III. — Ricerche fisiologiche e biologiche.

A. — Sviluppo culturale e variazione dei caratteri.

Questo fungo forma colonie molto varie, dapprima bianche e poi grigie o olivacee, con abbondanza o con assenza completa di micelio aereo, almeno fino ad un certo periodo di sviluppo. Le prime sporificano subito e

assumono colori molto diversi per la quantità e la pigmentazione dei conidî, che come abbiamo visto è molto variabile; le seconde invece rimangono sterili per un tempo relativamente lungo e presentano un fitto feltro dapprima liscio e glabro e poi grinzoso, costituito da ife sviluppatesi parallelamente, e costipate le une alle altre, formanti spesso densi cordoni che talora si elevano dal substrato a guisa di sinnemi molto diversi e irregolari.

In queste ultime la sporificazione ritarda a presentarsi e spesso compare nel micelio sommerso, per cui la colonia pur restando sempre liscia e glabra, presenta qua e là macchie di un verde scuro che finiscono per estendersi a tutta o a buona parte della colonia; la sporificazione aerea è data sovente da pseudosinnemi conici, costituiti dall'estremità di cordoni striscianti, staccatisi dal feltro, oppure ancora dal micelio aereo che dopo alcuni giorni si sviluppa nelle colonie, costituendo il più delle volte zone concentriche rilevate, alternate a zone glabre o con pochissimo micelio aereo.

Fra questi due estremi, che si possono avere sul medesimo substrato e nella stessa piastra di coltura in modo che l'alimento e tutti i fattori ambientali siano perfettamente identici per le due colonie, c'è un'infinità di colonie diverse, che si possono ottenere da colture derivate da un' unica spora, con differenze marcate nella quantità e qualità del micelio aereo, nella sporificazione aerea o sommersa, nel colore, nell'accrescimento e in tutti gli altri caratteri culturali che fino a pochi anni addietro servivano a individuare le specie microbiche, ma che oggi, dopo gli studi recenti su la genetica dei funghi, non possono assolutamente avere alcun valore specifico.

Tali caratteri però se non valgono per la determinazione della specie non vuol dire che abbiano perduto tutta la loro importanza, spesso — come ho scritto in un altro lavoro — « quello che più importa al micologo

e al patologo non è il nome specifico in sè stesso ma la conoscenza del maggior numero possibile di caratteri peculiari » [5] e tale conoscenza non si può avere senza un minuzioso esame dello sviluppo nelle diverse condizioni ambientali, il quale ci porta a stabilire la purezza genetica del clone da cui una data colonia è derivata e a separare i diversi stipiti che costituiscono la specie.

*
* *

Nei fenomeni di variazione di alcune specie fungine si constata spesso una variazione contemporanea e proporzionale di caratteri morfologici e fisiologici, in altri la variazione dei due ordini di caratteri è sproporzionata e si possono avere delle differenze morfologiche molto marcate senza una corrispondente variazione dei caratteri fisiologici, come è stato osservato nei *Fusarium* da me [7] e da altri autori, oppure il caso inverso, che è il più frequente, in cui l'attività fisiologica della specie si sposta, mentre la morfologia continua a presentarsi identica o poco variata (1).

In questo ultimo caso rientra certamente l'*Acremoniella thermophila,* nella quale il principale carattere morfologico dato dalla struttura e dalle dimensioni dei conidî rimane quasi costante nelle più varie condizioni ambientali, mentre i caratteri culturali e fisiologici variano sensibilmente.

Lasciando da parte tutte le fluttuazioni che si osservano nelle colture per le variate condìzioni ambientali, ossia tutte le variazioni indotte dall'alimento e da altri

(1) Su questi rapporti dovrebbe meglio basarsi la tassonomia micologica moderna la quale non può essere identica ed uniforme per tutte le classi, gli ordini, le famiglie e i generi. In certi aggruppamenti micologici il valore dei caratteri morfologici è molto relativo e non possono questi disgiungersi da quelli fisiologici, in altri aggruppamenti invece tali caratteri sono più costanti e possono anche senza l'ausilio dei caratteri fisiologici servire a differenziare le specie.

fattori che possano condizionare e dirigere l'attività del micelio del fungo allo sviluppo di certi caratteri, i quali ritornano alle primitive condizioni non appena lo stimolo esterno cessa, vediamo di esaminare le variazioni che il fungo presenta nelle identiche e costanti condizioni; variazioni dipendenti non da fattori esterni, ma da fattori interni, riguardanti la costituzione genetica dell'organismo e le incontrollabili azioni che in esso si verificano, per cui la cellula fungina è spinta ad uscire dai limiti dell'organizzazione tipica, e a manifestare variazioni leggere o variazioni brusche e marcate delle quali talune reversibili e altre non reversibili.

Queste variazioni, non condizionate da qualsiasi fattore esterno, che si manifestano nelle colonie del fungo non come variazioni graduali e continue, ma improvvise, rientrano in quel gruppo di variazioni che da molti autori vengono denominate *discontinue* [2] [28], sebbene si manifestino assai diversamente: alcune riguardano semplici fluttuazioni morfologiche, altre invece caratterizzano spesso la segregazione dallo stipite originario di piccole specie o di razze biologiche nuove.

Tali variazioni sono state studiate specialmente su un agar sintentico molto semplice (terreno C) composto di:

acqua distillata	gr.	1000
fosfato bipotassico	»	1
solfato di magnesio	»	1
asparagina	»	1,5
glucosio	»	30 (1).

(1) La concentrazione dei principi nutritivi di questo substrato è stata stabilita in base alle ricerche sullo sviluppo e la variazione del *Fusarium Moronei* Curzi che ho già riassunto in una nota preliminare (7) e che tratterò in esteso in una memoria che prossimamente verrà data alle stampe. Le proporzioni di asparagina e di glucosio corrispondono al migliore accrescimento delle colonie di questo *Fusarium*. Il solfato di magnesio trovasi in quantità un po' troppo

Esse sono di tre tipi diversi che io esaminerò sotto i nomi di: 1) variazioni fluttuanti; 2) variazioni a salti alternanti; 3) variazioni a salti non o parzialmente reversibili.

1. — Variazioni fluttuanti.

Sotto questa doppia denominazione intendo comprendere tutte le lievi variazioni che compaiono nelle colture cloniali del fungo a macchie irregolari, indipendentemente dalle condizioni ambientali. Esse non sarebbero quindi delle vere *modificazioni,* le quali secondo il concetto del Baur sono strettamente relative ai fattori esterni, ma delle fluttuazioni indotte da fattori interni che si manifestano irregolarmente nelle colture del fungo, e specialmente nelle colonie di alcuni stipiti, con macchie varie che risaltano per lo sviluppo e per l'aspetto, nel micelio aereo o nel feltro delle colonie.

Le macchie di variazioni fluttuanti non debbono però confondersi con altre macchie apparentemente simili che compaiono ad aree isolate nel mezzo delle colonie; in questo caso la macchia è più netta perchè deriva da una differenziazione miceliare nella parte vecchia della coltura, e ha lo stesso valore del settore che si forma quando tale differenziazione avviene nella parte periferica della colonia. In questo caso dal trapianto delle spore e del micelio si può avere uno stipite differente da quello originario, dalle macchie di variazioni fluttuanti, invece nel trapianto i caratteri non permangono nelle nuove colonie e per questo non può trattarsi che di semplici oscillazioni le quali non coinvolgono affatto l'intima costituzione genetica del plasma.

Una caratteristica variazione fluttuante è presentata da uno stipite a colonie glabre con micelio aereo rado e

---

elevata in confronto del fosfato bipotassico, per aumentare nel substrato le sue speciali proprietà cromogene, tanto utili nella differenziazione degli stipiti.

scarsissimo. Tali colonie mostrano talora macchie olivacee oscure per un'abbondante fruttificazione nel micelio sommerso, le quali sono molto varie e mai si presentano a settori; spesso in queste macchie il micelio aereo è assente e sembra proprio che la sporificazione si sia manifestata per la mancata produzione delle ife aeree da parte delle ife striscianti del velo superficiale (Tav. III, fig. 3).

2. — Variazioni a salti alternanti.

Dal trapianto di una colonia monoconidica su oltre due dozzine di piastre preparate col medesimo terreno ho osservato, che alcune colonie si sviluppavano con una parte senza micelio aereo e formavano un denso velo bianco perlaceo mentre il resto della colonia rassomigliava alla coltura originaria. Questa variazione si estendeva a metà della colonia oppure a una parte soltanto, circoscritta per lo più a un settore, il quale, per quanto non ben delimitato, aveva spesso tutta l'apparenza di una variazione settoriale non reversibile.

Trapiantando su piastre preparate col solito terreno C tanto la parte lanuginosa della colonia (A) quanto quella glabra (B), si avevano sovente due colonie perfettamente distinte, come la colonia originale e la zona variante, ma invertite: da A si aveva B e da B si aveva A. Questa inversione si è poi ripetuta regolarmente in ogni trapianto fino a quando non ho smesso dopo diciotto passaggi.

I trapianti venivano fatti sempre nel medesimo substrato e dopo sei giorni di sviluppo delle colonie a 36°-38° C., prendendo sempre tanto per A quanto per B, le estremità delle ife periferiche delle colonie, in modo che le condizioni fossero identiche, dato che nella colonia B la sporificazione avveniva molto tardi e in gran parte nelle ife sommerse.

La reversione che avviene in ogni generazione è integrale e il fenomeno ci offre un esempio di una vera variazione a salti, regolare, alternante.

L'età del micelio come la composizione del substrato non influiscono sulla regolare manifestazione della variazione: tanto il micelio periferico quanto quello centrale nelle due colonie, hanno ripetuto integralmente il fenomeno e così pure, quando i trapianti venivano fatti su altri substrati nutritivi, come agar carote glucosato, agar patata glucosato e infuso di frumento agarizzato e glucosato.

Non sempre però il fenomeno si manifesta come sopra l' ho descritto (1° caso), spesso nel trapianto dei due stipiti si va incontro a nuove variazioni che si presentano a settori i quali possono rappresentare l'inizio di altre serie di variazioni identiche reversibili in ogni generazione (2° caso), o di serie non reversibili e uniformi (3° caso).

Nella figura 9 riporto lo schema di questa variazione in cui il colore nero rappresenta lo stipite originale (A) e quello bianco lo stipite variante (B). Nel secondo caso da B si ha un settore identico ad A il quale trapiantato sviluppa una colonia simile a B, e da A si ha un settore identico a B il quale trapiantato sviluppa una colonia simile ad A; la reversione si ripete poi regolarmente nelle due nuove serie come nelle due serie originali del primo caso. Nel terzo caso invece da B si ha un settore *a* apparentemente identico ad A, ma che si mantiene sempre lo stesso nei successivi trapianti, e da A si ha un settore *b* apparentemente identico a B, ma che si mantiene pure uniforme nei successivi trapianti.

Questo tipo di variazione non mi risulta che sia stato descritto da altri autori. Horne e Das Gupta [16] nelle colture di *Diaporthe perniciosa* descrivono sotto il nome di « ever salting » una variazione a salti periodici che potrebbe avere qualche affinità con quella da me riscontrata nell'*Acremoniella thermophila;* ma, come ho già detto, nel fenomeno da me osservato non ha alcuna influenza l'età del micelio, dalla quale invece dipendono in gran parte le variazioni della *Diaporthe perniciosa*.

Alle variazioni a salti alternanti dell'*Acremoniella thermophila* si possono dare due spiegazioni diverse a seconda che la coltura monosporogenita originaria si voglia considerare come costituita da un unico stipite o da due stipiti mescolati insieme, tendenti sempre a separarsi.

Nella prima spiegazione, le due colonie A e B dovrebbero rappresentare due fasi opposte dello stipite puro, le quali comparirebbero alternativamente nei successivi trapianti, per una inversione della facoltà di estrinsecazione, per cui la fase nascosta verrebbe a trasformarsi in quella manifesta e viceversa, di generazione in generazione; i settori dovrebbero rappresentare o delle inversioni incomplete (2° caso) o delle mutazioni vegetative con la perdita della fase opposta (3° caso). In questa concezione che richiama alla mente una lontana idea del Morgan in riguardo al fattore dominante e a quello recessivo, i quali non sarebbero che due stadî differenti di un unico fattore, non sembra che il fenomeno possa trovare però la sua vera probabile interpretazione. Molto migliore a me sembra la seconda spiegazione della variazione, nella quale bisogna ammettere che la spora che ha dato luogo alla coltura cloniale non sia geneticamente pura e che dal micelio derivato si siano segregati i due stipiti A e B, i quali sarebbero presenti insieme in tutte le colonie successive con la dominanza o la recessività alternativa dell'uno o dell'altro. Nella seconda generazione si verrebbe ad avere la separazione dei due stipiti, ma questa separazione non sarebbe che apparente, perchè A conterrebbe allo stato latente anche B e B conterrebbe allo stato latente anche A, per cui nelle successive generazioni si avrebbe il regolare esaltamento di A e di B di generazione in generazione (Fig. 9). I settori che verrebbero a comparire in alcune colonie o sono dei tentativi di segregazione (2° caso) o sono delle segregazioni pure (3° caso).

Nel secondo caso i settori non sono netti e spesso non

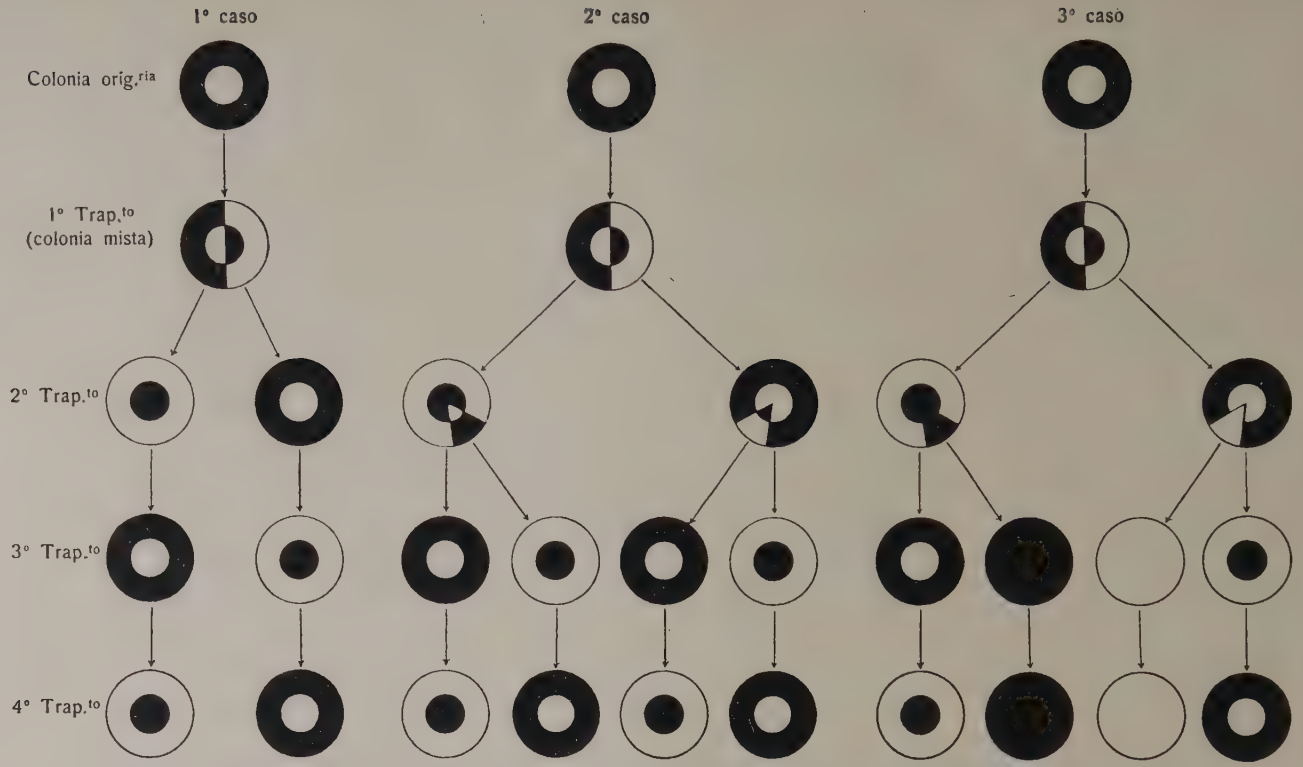

Fig. 9. — Schema delle variazioni a salti alternanti in cui il nero indica la colonia originaria (A) e il bianco la variazione (B). I cerchi interni stanno a indicare la recessività della fase o dello stipite opposto a seconda le due interpretazioni del fenomeno date nel testo.

hanno limiti geometrici regolari; nell'ultimo caso invece i settori compaiono nettamente e regolarmente delimitati; da essi si hanno due linee pure (*a* e *b*) delle due colonie che si conserverebbero indefinitamente tali nelle successive generazioni e che soltanto per nuove variazioni settoriali potrebbero dare luogo ad altre forme.

3. — Variazioni a salti non o parzialmente reversibili.

Fin dalle prime prove colturali sono stato colpito dalla grande comparsa dei settori nelle colonie di questo ifomicete. Basta osservare infatti la fotografia 1 della tavola III per farsi un'idea della frequenza delle variazioni settoriali nelle sue colonie. Tale fotografia riguarda una coltura del fungo ottenuta da un trapianto di una colonia purissima derivata, dopo diversi passaggi, da una coltura di un conidio prelevato direttamente dall'embrione di una cariosside alterata di frumento.

In questa coltura, ottenuta su agar infuso di cariossidi di grano glucosato al 2%, si possono distinguere almeno cinque settori ben distinti l'uno dall'altro per abbondanza o scarsezza del micelio aereo, per la colorazione che va dal bianco candido all'avellaneo e dal grigio al fumoso o al verde scuro, per la zonazione, per la quantità e la grossezza delle goccie di liquido (perle) che si condensano al disopra del micelio aereo, per la frequenza e l'epoca della sporificazione e per altri caratteri minori.

Di ciascun settore vennero fatte diverse colture monospore in piastre preparate con lo stesso substrato nutritivo, le quali, se in gran parte corrispondevano ai settori da cui derivavano, non mancavano alcune che presentavano caratteri differenti e talora nuovi. Non tutti i conidî sono quindi geneticamente uguali e il micelio sviluppato da due conidî apparentemente identici può presentare un dimorfismo manifesto e dar luogo a due colonie del tutto differenti.

Per non complicare le ricerche ho lasciato da parte le variazioni conidiali ed ho scelto per ciascun settore una colonia uniforme che più d'ogni altra corrispondesse ai caratteri presentati dal settore-stesso. In questo modo ho separato cinque stipiti del fungo che indico con le lettere α, β, γ, δ, ε e che descrivo sommariamente, riportando i caratteri presentati dagli stipiti su agar sintetico C dopo sei giorni di sviluppo alla temperatura ambiente di 38° C.

α. - È lo stipite che presenta il micelio aereo più abbondante e più alto e nell'insieme più vigoroso anche di quello del settore originale; tale micelio è lasso, lanoso, di colore avellaneo, eccetto nel centro della colonia ove tende al fumoso e nella parte periferica ove forma una zona bianco-candida.

Questo stipite è molto instabile ed in esso ho solo osservato il fenomeno delle variazioni a salti alternanti che ho sopra descritto. Raramente le colonie si presentano senza settori i quali per lo più si manifestano con assenza completa o con poco e rado micelio aereo, specialmente verso la periferia (Tav. III, fig. 2 e 3).

β. - È molto simile al precedente; come questo ha il micelio aereo abbondante ma meno alto e più denso. Le colture si presentano con una zona bianca esterna e poi subito con una piccola zona bianco sporca che sfuma presto e si confonde con il resto della colonia tendente al corallino scuro con un gran numero di gocce di liquido, le quali sono più dense e più grandi nel mezzo e sempre più piccole e rade verso la periferia (Tav. IV, fig. 4).

È uno stipite piuttosto stabile, ma con i caratteri culturali leggermente oscillanti di trapianto in trapianto.

γ. - Differisce da β per il micelio aereo meno alto e più denso e che rimane più a lungo sterile. Le colonie sono bianche ed hanno la parte centrale tinta leggermente di avellaneo con sfumature grigiastre e numerose gocce di liquido (Tav. V, fig. 2).

δ. - Questo stipite è molto diverso dai precedenti;

esso è caratteristico per la scarsità del micelio aereo, per la zonazione e per il colore il quale non è mai avellaneo. Le colonie si presentano nel centro plumbee e assumono verso la periferia una tinta fumosa fino al grigio chiaro e al bianco; tali colonie sono imperlate di minutissime gocce di liquido e presentano zone appena accennate (Tav. V, fig. 1).

ε. - Simile a δ ma è più ricco di micelio aereo e ha la zonazione più marcata. Le colonie sono nel mezzo atromurine, poi fumose e infine sono limitate da una zona bianco-candida (Tav. V, fig. 3).

a) — *Rapporti e variazioni negli stipiti cloniali.*

Questi cinque stipiti derivati da una coltura monosporogenita, in base alla colorazione delle colonie si possono raggruppare in due gruppi distinti: nel primo rientrano i primi tre, α, β e γ, i quali presentano un fondo comune avellaneo-umbrino; nel secondo gli altri due, δ e ε, con una colorazione grigio-ardesiaca.

I primi tre rappresentano una scala decrescente da α a γ non solo per il colore ma anche per il micelio aereo e per la sporificazione i quali gradatamente diminuiscono, tanto che gli ultimi β e γ sembrano delle colonie di α che abbiano perduto sensibilmente di vigore nella manifestazione di ogni carattere; questa relazione è provata anche da alcune variazioni di α rassomiglianti a β e a γ, e di β rassomiglianti a γ.

Gli altri due stipiti, δ e ε, sono sufficientemente distinti fra loro e non possono avere alcun rapporto affine all'infuori del colore e dell'origine comune da un'unica colonia.

Di tutti questi stipiti cloniali, gli intermedi, i quali hanno minore quantità di micelio aereo, sono i più stabili, mentre gli estremi, α e ε, i quali sono i più ricchi di micelio aereo, sono i meno stabili. Le colonie di questi

ultimi possono presentare quasi sempre dei settori con micelio aereo minore come gli stipiti cloniali intermedi.

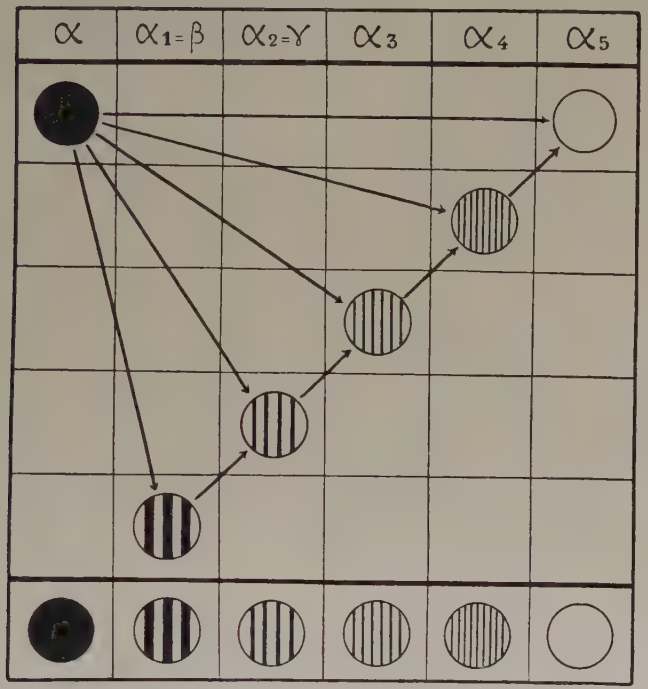

Fig. 10. — Schema di variazione dello stipite α con graduale diminuzione dei caratteri.

Dallo stipite α si possono separare numerose colonie che formano una scala decrescente dei caratteri principali presentati dalla colonia originale (1); cinque di queste colonie costituiscono gli stipiti α_1, α_2, α_3, α_4 e α_5 che formano con la coltura originale una serie continua nella quale i caratteri presentati dallo stipite α vanno man mano diminuendo, cosicchè tanto il micelio aereo, quanto

(1) Tutti i caratteri culturali riguardano sempre le colonie dopo 6 giorni di sviluppo a 38° C. su terreno *C*, adoperato nella differenziazione degli stipiti cloniali.

la colorazione e la sporificazione, massime in α, sono ridottissime in α_5 o anche assenti durante l'accrescimento progressivo delle colonie (Fig. 10); soltanto in seguito, quando l'accrescimento delle colonie diminuisce per effetto dell'autointossicazione del substrato, nell'α_5 si sviluppa il micelio aereo e si ha la sporificazione, per lo più abbondantemente sommersa.

Non è possibile poter tenere distinti tutti questi stipiti, specialmente l'α_2 dall'α_3 e questo dall'α_4, ma la differenza fra il primo e l'ultimo è così marcata che chiunque a prima vista considererebbe le colonie che essi formano sul medesimo substrato, come appartenenti a specie di funghi differentissime; alle colonie ricchissime di micelio aereo e di spore dell'uno, si contrappongono infatti le colonie dell'altro, consistenti dapprima in un velo tenacissimo liscio o ondulato, a raggiera o a embrice, senza il micelio aereo, il quale si sviluppa in seguito a zone concentriche che si iniziano dal centro delle colonie oppure anche dalla periferia, costituendo spesso candidi cordoni (Tav. IV, fig. 2).

Dall'α_5 per variazione settoriale si può separare un altro stipite, l'α_{5a}, non zonato, liscio e con poco e rado micelio aereo che viene su a ciuffi umidi e increspati; esso forma colonie molto instabili che presentano spesso dei settori di ritorno completo allo stipite α_5, come mostra la figura 3 della tavola IV, la quale riguarda una colonia dello stipite α_{5a} con diversi settori regolari di α_5 disposti in modo da dare alla colonia un aspetto stellato.

Dallo stipite ε si separa facilmente uno stipite ε_1, affine al precedente per sviluppo e vigore, ma diverso per il colore più scuro, formando colonie nel centro brune e zonate di fuligineo con leggeri riflessi vinosi, e verso la periferia grigiastre o leggermente glauche prima d'una zona bianca cotonosa esterna. Questo stipite è molto instabile; esso può dare luogo ad altri due stipiti in successione, l'ε_{1a} e l'ε_{1a1}. Le colonie del primo sono marcatamente zonate con ampie zone poco rilevate, hanno

il micelio aereo non abbondante e non tanto elevato, ma piuttosto denso e finemente imperlato di minutissime goccioline di liquido; nella parte centrale tali colonie sono fumose, poi verso l'esterno atro-fuliginee e infine sono delimitate da una zona un po' più chiara. Le colonie del secondo stipite sono molto simili a quelle del precedente, ma più chiare e più densamente zonate.

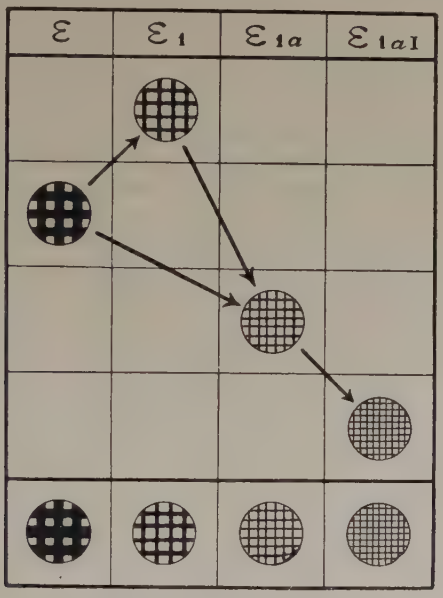

Fig. 11. — Schema di variazione dello stipite ε.

Nelle discendenze dello stipite ε non si ha una successione con progressiva e regolare perdita di caratteri come nelle discendenze dello stipite a, giacchè lo stipite ε_1 non può rappresentare una variazione regressiva di ε; ma abbiamo però una diminuzione progressiva di caratteri dall'ε_1 all'ε_{1a} e da questo all'ε_{1a1}; nel contempo dato che il penultimo si può ottenere anche direttamente dall'ε possiamo immaginare nella discendenza dello stipite due serie regressive convergenti nell'ultimo della serie ε_{1a1} come dallo schema della figura 11.

b) — *Reversioni e discussione.*

Di tutti gli stipiti derivati da α e da ε, soltanto cinque e precisamente α_8, $\alpha_{8\alpha}$, ε_1, $\varepsilon_{1\alpha}$ e $\varepsilon_{1\alpha 1}$ si possono distinguere senza difficoltà dagli stipiti cloniali e così possiamo considerare in tutto dieci stipiti diversi derivati da un conidio dopo vari trapianti della coltura monosporogenita.

Tutti questi dieci stipiti sono stati coltivati contemporaneamente su piastre preparate col medesimo substrato C e poste nelle identiche condizioni ambientali. Dopo una diecina di giorni le colture venivano trapiantate su nuove piastre preparate di fresco e l'esperimento fu ripetuto una dozzina di volte per un periodo di tempo non inferiore a quattro mesi, allo scopo di osservare e seguire le eventuali reversioni.

La gran parte delle colonie di questi stipiti del fungo hanno offerto dei settori di variazione i quali rappresentano nuovi tipi d'accrescimento o la riproduzione parziale o totale di alcuni dei dieci stipiti considerati. Eccetto le leggiere fluttuazioni dei caratteri culturali, le variazioni avvenivano sempre per settori e così da uno stipite inferiore si poteva avere un settore di ritorno a uno stipite superiore (7). Le vere reversioni però che ho potuto osservare durante queste prove culturali, riguardano soltanto gli stipiti inferiori delle due serie di variazioni di α e di ε, e cioè l'$\alpha_{8\alpha}$ che ha sempre dato dei settori di ritorno integrale in α_8 e l'$\varepsilon_{1\alpha 1}$ che ha presentato qualche settore di ritorno in $\varepsilon_{1\alpha}$; oltre questi due stipiti, infimi nelle scale genealogiche di α e di ε, non ho mai osservato, durante tutto l'esperimento fatto, delle reversioni, ma semplicemente dei ritorni incompleti e così non mi è mai capitato di avere dei settori dall'$\alpha_{8\alpha}$ e dall'$\alpha_{8\alpha 1}$ in α o in β e γ, e mai dall'$\varepsilon_{1\alpha 1}$ e dall'$\varepsilon_{1\alpha}$ dei settori di ritorno integrale in ε_1 o in ε.

Ad eccezione dei due casi sopra indicati, quando uno stipite inferiore di una serie di variazioni manifesta

qualche settore di ritorno in uno stipite superiore, dal confronto della coltura di quest'ultimo con quella ottenuta dal settore, si osservano sempre delle diversità che

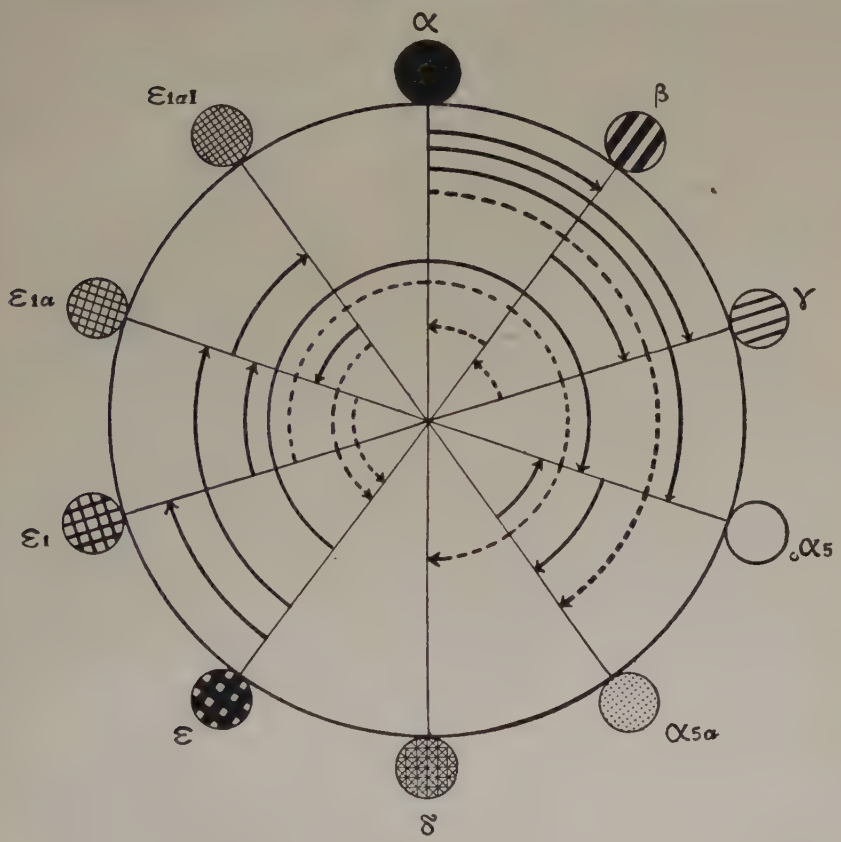

Fig. 12. — Grafico delle derivazioni e delle reversioni osservate. Le frecce nel senso delle lancette dell'orologio indicano le derivazioni, quelle nel senso contrario le reversioni. Le linee intere le derivazioni e le reversioni complete, quelle punteggiate le derivazioni e le reversioni incomplete.

persistono nelle successive generazioni. In questo ifomicete si hanno cioè gli stessi ritorni approssimativi osservati da F. Chodat [3] nel *Phoma alternariacearum* Br. et Searle, nel quale le forme ottenute si avvicina-

vano ma non si identificavano con gli stipiti già conosciuti.

Questi ritorni incompleti contrastano con le concezioni di alcuni autori [2] i quali tendono ad ammettere che le formazioni settoriali nelle colture fungine siano dovute a combinazioni e dissociazioni di stipiti diversi appartenenti a una data entità specifica.

Non voglio del tutto escludere tali fenomeni, ma in tal caso è chiaro che la reversione di uno stipite in un altro debba essere completa; invece in questa e in altre specie fungine si notano delle diversità fondamentali che lasciano intravvedere una forza insita nel protoplasma stesso il quale spinge la cellula micelica a variare in un senso o nell'altro indipendentemente da qualsiasi impurezza genetica come se ci trovassimo di fronte ad autentiche *mutazioni,* siano pure vegetative. È vero che non possiamo usare questo termine con una certa sicurezza per indicare tali variazioni che il più delle volte potrebbero riguardarsi come segregazioni di uno stipite geneticamente impuro per un'ibridazione o per la plasmogamia di miceli di stipiti diversi; ed è vero anche che in molti casi dove è stato usato il termine « mutazione » si è poi constatato trattarsi di effetti di vere *combinazioni,* ma quando in una specie, come nella *Acremoniella thermophila,* riscontriamo nelle colture monosporogenite delle variazioni così nette e marcate, e separiamo nelle medesime controllate condizioni ambientali numerosissimi stipiti con ritorni agli stipiti originali raramente integrali, non si può non pensare che queste variazioni settoriali non siano dovute a vere modificazioni del plasma vegetativo e non a normali segregazioni.

Pur ammettendo l'impurezza nella sconosciuta costituzione genetica della spora che ha sviluppato la colonia originaria, i fatti osservati nel complesso fenomeno di variazione di questo ifomicete, tendono a far rilevare più che altro la tendenza del plasma alla variazione brusca.

E se una simile impurezza dovesse realmente esistere, essa probabilmente potrebbe rappresentare nella cellula vegetativa del fungo un potente stimolo per tale variazione.

B. — Influenza della temperatura su lo sviluppo culturale e su la selezione degli stipiti.

Per lo sviluppo alle varie temperature mi son servito di uno stipite del fungo appena isolato, rassomigliante molto a *β*, che sopra ho descritto, il quale fra l'altro mi offriva una certa garanzia di stabilità in confronto degli altri stipiti.

Le prove vennero iniziate a 24° C. e ripetute a temperature sempre crescenti di tre gradi in tre gradi fino a 60° C. Esse non vennero fatte contemporaneamente per mancanza di tanti ambienti riscaldati a temperature varie, ma l'una di seguito all'altra, servendomi però, nel trapianto alle diverse temperature, sempre di un'unica coltura originaria mantenuta costantemente a 35° C., e ciò per togliere di mezzo ogni possibile adattamento che potesse verificarsi nel fungo man mano che dalle temperature inferiori di sviluppo si saliva a quelle superiori.

Gli esperimenti furono eseguiti abbinati su due termostati differenti a riscaldamento elettrico e su due terreni distinti, e cioè su infuso di grano agarizzato (*a*) e su terreno C (*b*). Nelle due prove il fungo inizia a svilupparsi a 27° C. molto lentamente, senza un accrescimento manifesto; nel punto d' inoculazione si sviluppano delle ife le quali non si accrescono ulteriormente fintanto che la temperatura non venga elevata a 30° C. A questo grado di calore l' accrescimento incomincia a manifestarsi evidente, e dopo sei giorni dal trapianto il diametro medio delle colonie è di circa 3 millimetri in *a* e 6 millimetri in *b;* nei gradi superiori di temperatura l'accrescimento aumenta rapidamente e progressivamente fino a 42° C. in *a* e a 45° C. in *b*, per poi decrescere fino

a 54° C., che segna il limite massimo di accrescimento dello stipite del fungo (Fig. 13).

I dati ottenuti, i quali riguardano le colture dopo sei giorni di sviluppo, sono riportati nel seguente quadro:

Temperature	Diametro medio delle colonie	
	su agar infuso di grano (*a*)	su agar sintetico *C* (*b*)
27° *C*	—	—
30° »	mm. 3	mm. 6
33° »	» 30	» 34
36° »	» 35	» 40
39° »	» 66	» 78
41° »	» 87	» 94
45° »	» 71	» 100
48° »	» 45	» 80
51° »	» 5	» 20
54° »	—	» 6

Dall'esame di questi dati, si nota già una leggera diversità nelle curve termiche delle due prove, malgrado che la coltura del fungo usata in ogni singolo trapianto fosse sempre quella. Nell'agar infuso di cariossidi di grano il migliore sviluppo si ha a 42° C., mentre nel terreno C, più ricco di sostanze zuccherine, l'ottimo si spinge fino a 45° C. e quindi anche la composizione del substrato nutritivo influisce nello spostamento dell'ottimo di temperatura.

Tanto l'ottimo quanto il massimo di temperatura possono variare però entro limiti estesi, per altre ragioni che non sono in relazione con la composizione del substrato.

Confrontando i dati da me ottenuti con quelli riportati dai vari autori che si sono occupati del fungo, indipen-

dentemente l'uno dall'altro, senza cioè la conoscenza delle ricerche già fatte, troviamo che mentre il minimo è sempre vicino a 30° C. il massimo è a 60° C. secondo il Miehe [21] e secondo Griffon e Maublanc [13], e a 62°-63° C. secondo Rege [31].

Questa diversità nel limite massimo di temperatura mi fece a tutta prima pensare che i diversi autori si fossero trovati di fronte a specie diverse; ma dopo l'esame della coltura del Rege e dopo l'isolamento del fungo dal materiale vegetale soprariscaldato con i metodi indicati dal Miehe [21], non poteva più esserci un simile dubbio e mi convinsi che la diversità dei dati non potevano essere dovuti ad altro che a una certa plasticità di comportamento del fungo nelle diverse condizioni termiche.

Alcune prove di saggio appositamente istituite mi convinsero subito che i punti termici di sviluppo non erano affatto costanti. I dati da me ottenuti riguardavano un determinato stipite del fungo, isolato dal materiale trovato in natura e mantenuto costantemente a 35° C. Le prove fatte con ogni cura e ripetute per eliminare ogni possibile causa di errore, non potevano dare risultati più precisi. Ma partendo da colture del fungo mantenute per diverso tempo a 50° C. ho potuto osservare lo sviluppo anche a 58° C., poi a 60° C. e più.

Queste prove di saggio mi spinsero a fare ricerche sull'adattamento del fungo a temperature sempre crescenti.

Il solito ceppo della coltura a 35° C. venne trapiantato su alcuni tubi preparati con terreni differenti e cioè: terreno C, infuso di grano agarizzato e agar fagioli agarizzato e glucosato al 2%. Tali tubi vennero posti su un termostato « Weber », che il Prof. Petri mi acquistò appositamente, regolato a 30° C.; dopo alcuni giorni il fungo veniva trapiantato su nuovi tubi, mentre la temperatura del termostato era stata elevata a 32° C. L'operazione ripetuta ogni quattro o sei giorni a temperatura sempre crescente di due gradi in due gradi, mi ha portato a osservare che il fungo non solo si sviluppava benissimo

a 60° C., ma poteva di molto superare questo limite e quello notato dal Rege (62°-63° C.), e svilupparsi indifferentemente a 68° C. e fino al punto mortale corrispondente a 70° C.

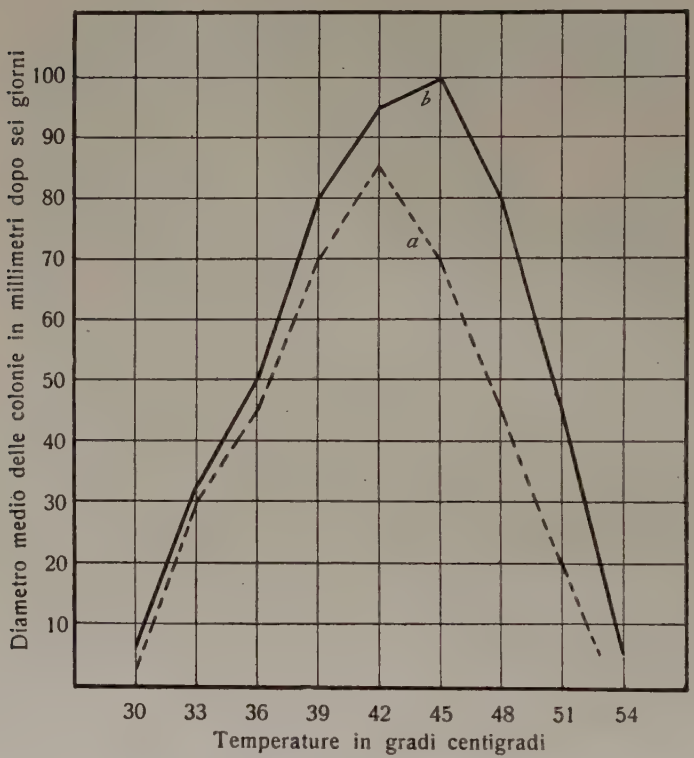

Fig. 13. — Grafico dello sviluppo alle varie temperature dello stipite β (mantenuto per molto tempo a 35° C., su agar infuso di cariossidi di grano (*a*) e su agar sintetico C (*b*).

Lo stesso stipite del fungo che nelle prime prove, nelle quali mi son servito sempre del trapianto di una coltura a 35° C., mi aveva dato il suo massimo a 54° C., nelle prove nelle quali mi son servito di trapianti di colture sviluppatesi a temperature progressivamente crescenti, mi si era sviluppato anche a 68°-70° C. cioè sino alla

temperatura massima di resistenza del protoplasma del fungo.

Non mi risulta che adattamenti simili siano stati osservati nei funghi; mentre la letteratura riporta diversi casi di adattamenti di altri ordini di microrganismi.

Il Löwestein [18] ha riferito su un certo adattamento termico di un'alga nelle sorgenti di Karlsbad, il quale però non permane e cessa rapidamente. Il Dieudonné[10] riesce a spostare il massimo del *Bacillus fluorescens* da 35° a 41,5° C. e Tsilinski trova che alcuni bacilli del fieno, il cui massimo normale si aggirava intorno ai 50° C., poteva essere portato a 58° C. Ma l'esperimento più classico al riguardo è quello fatto dal Dallinger[8] che sotto Carlo Darwin iniziò a coltivare tre specie di flagellati a temperature sempre più alte in un termostato molto preciso. Tale esperienza minuziosa e accurata durò sette anni; essa venne iniziata alla temperatura di 15,5° C., e dopo quattro mesi i flagellati si sviluppavano a 25° C. cioè oltre il limite massimo di sviluppo che era di 23° C. In tale temperatura rimasero otto mesi senza che fosse possibile alcun aumento, ma dopo questo periodo di tempo i flagellati riuscirono a sopportare i 26,6° C., e nei nove mesi successivi i 34° C., e finalmente dopo lunghe pause si arrivò a 70° C., con lo spostamento del limite massimo di temperatura da 23° a 70° C. e cioè di circa 47° C.

Il punto mortale dell'*Acremoniella thermophila* si aggira intorno ai 70° C. Il micelio che si era sviluppato alla temperatura di 68°-70° C. muore dopo 24 ore di permanenza alla temperatura costante di 70° C. e alla temperatura oscillante di 70°-72° C.

Il limite massimo di sviluppo si confonde quindi con quello di resistenza del plasma alla temperatura. Questa coincidenza dei due punti termici nella vita del fungo è molto importante non solo dal punto di vista scientifico, ma anche da quello pratico.

In base alle mie ricerche e a quelle classiche di Dallinger [8] e di altri si può concludere che il massimo

di temperatura nella vita dei microrganismi è molto variabile, e quello conosciuto riguarda semplicemente il *maximum* di un dato stipite della specie nelle particolari condizioni in cui le ricerche sono state eseguite. Fin tanto che non si raggiunga il punto mortale della temperatura non si può mai asserire che un dato microrganismo non si sviluppi al disopra del massimo conosciuto; gli adattamenti ottenuti artificialmente potrebbero verificarsi anche in natura, e così nelle masse di fieno, di paglia, di semi in riscaldamento, nelle quali l'*Acremoniella thermophila* vegeta, non possiamo escludere l'intervento attivo del fungo anche oltre i 60° C., contrariamente a quanto hanno asserito altri autori. Fino a 70° C. lo sviluppo del fungo è sempre possibile, specialmente se il riscaldamento avviene lentamente o meglio ancora a sbalzi, come si verifica spesso in natura per variate e improvvise condizioni ambientali.

*
* *

Lo sviluppo del fungo a temperature superiori all'usuale avviene per un adattamento graduale oppure per segregazione di stipiti meglio resistenti a quelle date condizioni di temperatura?

La mia esperienza è stata eseguita su tubi e non su piastre di coltura, e per questo non ho potuto seguire il fenomeno della variazione delle colonie alle diverse temperature; quanto prima però ripeterò l'esperimento per meglio rispondere al quesito suesposto.

Pertanto, le osservazioni fatte mi portano già ad affermare fin d'ora che l'adattamento della specie avviene per comparsa di stipiti. Infatti la coltura del fungo sviluppatasi a 65°-70° C., riportata nei termini biologici inferiori di calore, è tutta diversa da quella dell'inizio dell'esperienza, le due colture manifestano un marcato dimorfismo che resta costante nei numerosi successivi trapianti; e non possono non riguardare due stipiti differenti del fungo (Tav. VI, fig. 3).

Le differenze esistenti fra lo stipite ottenuto per selezione termica, che chiamo T, e quello originale (β) sono molto marcate e superiori a quelle che caratterizzano i cinque stipiti cloniali sopra descritti.

Nelle soluzioni nutritive secondo la seguente formula:

sostanza idrocarbonata . .	gr.	30
peptone Withe	»	10
acqua	»	1000

i due stipiti manifestano caratteri morfologici e fisiologici varî a seconda dello zucchero adoperato.

Dalle colture dopo 15 giorni di sviluppo a 40° C., si ebbero i seguenti risultati:

Saccarosio. — Le due colture si presentano uguali e il liquido rimane sempre costantemente identico a quello della soluzione sterile; all'osservazione microscopica però mentre β sporifica, T non sporifica affatto, ma presenta invece un gran numero di oidalee terminali delle quali molte all'estremità di brevi ramificazioni miceliche laterali, che potrebbero essere dei conidiofori anormali o meglio imperfettamente sviluppati (Fig. 4).

Glucosio. — Le colture sono quasi uguali; l'unica differenza esistente è che il liquido della soluzione in T è appena un po' più colorato che in β. Tanto nell'uno quanto nell'altro stipite i caratteri morfologici del fungo restano identici; il micelio rimane sterile e non presenta nemmeno ben differenziati i cellarioli e le oidalee.

Lattosio. — In questo zucchero il liquido della coltura di T è gialliccio e più colorato che il liquido della coltura di β che resta invariato nel colore costantemente paglierino pallido come nella soluzione sterile. Ambedue gli stipiti sporificano, producendo conidî piuttosto piccoli i quali in β hanno un episporio speciale, spesso e muricolato, mentre in T l'episporio è tenue e piuttosto uniforme.

Amido. — Le due colture differiscono nettamente per la colorazione invariabilmente ialina o leggermente lat-

tescente in β, mentre in T è rossiccia con i bordi del velo micelico aderente al vetro del tubo atro-purpurei. La sporificazione è abbondante nei due stipiti con la produzione di spore ben mature e sviluppate, fornite d'un esosporio molto spesso e distintamente subreticolato.

In questa soluzione compare una caratteristica speciale dello stipite T, che manca assolutamente, almeno nelle mie condizioni sperimentali, nello stipite β. Le ife presentano frequentemente delle incrostazioni color ruggine le quali sembrano non essere di natura diversa da quella delle sostanze che costituiscono l' involucro e che sono state riscontrate nelle ife miceliche di altri funghi [25] [27].

Arabinosio. — La coltura di β conserva il colore giallicio della soluzione sterile mentre la coltura di T è intensamente colorata ma non tanto quanto nell'amido. Manca la sporificazione, mentre sono presenti le incrostazioni, le quali sembrano leggermente più abbondanti di quelle che si formano nell'amido.

Maltosio. — In questo zucchero la differenziazione dei due stipiti è ancora maggiore. In β il colore della soluzione resta normalmente paglierino, in T invece assume un aspetto rossiccio tendente al baio, e il velo micelico si presenta quasi atro-purpureo per le ife avvolte da una grande quantità di sostanze incrostanti (Fig. 14). Queste incrostazioni che sono comparse soltanto nell'amido e nell'arabinosio, nel maltosio sono aumentate considerevolmente conferendo alla soluzione nutritiva la speciale colorazione giallo-rossiccia.

Lo stipite T oltre che differire per i caratteri culturali e anche morfologici si distingue quindi da β per una proprietà fisiologica di una certa importanza nella vita del fungo. Esso conferisce al substrato ricco di sostanze zuccherine, come è il terreno C, una colorazione rossa spesso molto intensa che manca assolutamente nello stipite β e negli altri stipiti che in questo lavoro ho chiamato « cloniali »; presenta tutte le caratteristiche cul-

turali di α_s (1), ottenuto a 40° C. per variazione settoriale di α, ed è forse il più termofilo di tutti gli stipiti che il fungo può segregare quale risorsa della specie per lo sviluppo a temperature elevate.

Fig. 14. — Incrostazioni nelle ife miceliche dello stipite T, in soluzione di peptone e maltosio dopo 15 giorni a 40° C., × 980 (C. l. Abbe-Apathy, Zeiss oc. 4, obb. E).

Tale stipite non si può considerare una fase di un determinato stipite come β, giacchè, ripetendo gli esperimenti con gli stipiti, γ e ε, alla fine delle prove mi son trovato sempre di fronte allo stesso stipite T. Potrebbe darsi che tanto β come γ e ε fossero degli stipiti complessi i quali avessero nascosto sotto le loro caratteristiche lo stipite T, ma a me sembra molto più probabile che quest'ultimo rappresenti una variazione brusca del plasma vegetativo, che potrebbe indifferentemente prodursi

(1) Malgrado questa rassomiglianza preferisco mantenere distinti i due ceppi, non tanto per l'origine diversa, quanto perchè non mi è stato possibile fare un confronto completo e dettagliato.

in qualsiasi ceppo e in qualsiasi cellula normale del fungo, quale vera mutazione vegetativa.

Ma qualunque sia l'interpretazione di questi risultati, lo stipite T è sempre quello che otteniamo per influenza della temperatura, la quale non è la causa diretta della variazione ma un fattore influente che eccita la comparsa e favorisce la selezione dello stipite.

Lo sviluppo del fungo a temperatura elevata oltre il *maximum* conosciuto non sembra quindi che possa avvenire per un semplice adattamento, ma per una selezione di forme sempre più termofile operata dalla temperatura.

Del resto anche nel classico studio di Dallinger [8] sui flagellati, se si fosse trattato di un vero adattamento, come venne ritenuto, esso sarebbe stato, secondo me, — sebben lentissimo — uniformemente progressivo; ma invece, quando a 25° C. ha dovuto attendere otto mesi, e altre attese più o meno lunghe si sono imposte a temperature superiori prima di arrivare a 70° C., vuol dire che a quelle date condizioni termiche, critiche per le tre specie di flagellati, si è dovuto aspettare la comparsa di forme più resistenti prima che fosse possibile un aumento anche lieve di gradi di calore.

*
* *

Lo sviluppo dell'*Acremoniella thermophila* fino a 68°-70° C. l'ho potuto ottenere finora soltanto con la temperatura continuamente oscillante di almeno due gradi, che ho realizzato dalla stufa elettrica « Weber », a circolazione d'aria, posta in una camera discretamente ventilata. In altre stufe, come nell' « Universal » della ditta Rastelli di Roma, pure a riscaldamento elettrico ma a circolazione d'acqua e nelle quali la temperatura si mantiene costante, lo sviluppo del fungo, dopo alcune prove fatte, si è sempre arrestato a gradi di calore molto inferiori ai 70° C., e spesso per poter aumentare la temperatura oltre i 53°-55° C. bisognava fare sviluppare an-

cora le colture al disotto di 40° C. e poi, nel trapianto successivo, riportarle di nuovo allo stesso grado di temperatura in cui lo sviluppo si era arrestato.

La temperatura oscillante, molto meglio di quella costante, ha quindi influenza sulle proprietà biologiche dell'organismo, favorendo quei cambiamenti fisici e chimici del protoplasma che portano alla comparsa e allo sviluppo di stipiti più termofili della forma originaria.

Lo stipite T riportato a bassa temperatura ha pure il minimo corrispondente a quello della coltura originale (β), mentre l' ottimo si sposta da 42° - 45° C. a 50°-55° C.; e così, il massimo e l'ottimo possono variare entro limiti assai vasti, e il minimo al contrario rimanere costante o quasi costante in tutti gli stipiti studiati. Il fungo non può quindi essere un termotollerante, e l'affermazione di Schillinger [35] che non esistono esseri viventi termofili ma solo termotolleranti, trova in queste osservazioni sull'*Acremoniella thermophila* una nuova smentita.

C. — Diffusione ed esistenza del fungo in natura.

Nei precedenti capitoli, parlando dei diversi autori che si sono occupati dell'*Acremoniella thermophila*, ho anche accennato che tale ifomicete è molto diffuso in natura per essere stato isolato in luoghi e in condizioni molto diverse. Il Miehe [21], che per primo si è occupato di questo fungo, dice d'averlo isolato tutte le volte che lo ha ricercato nei materiali vegetali autoriscaldati ed io sono riuscito ad averlo oltre che in un campione di frumento che aveva subito un autoriscaldamento in spiga [6] anche da un campione di frumento a cariossidi sane e normali lasciato per un certo periodo di tempo in un ambiente piuttosto umido riscaldato a 40°-50° C., e su paglia di frumento umida sminuzzata e compressa, posta pure nelle medesime condizioni termiche.

Queste osservazioni convergono a far rilevare la grande diffusione di questo ifomicete malgrado le sue caratteristiche termofile che ostacolano il suo sviluppo a temperatura ordinaria. Ma dove si sviluppa e da dove deriva una tale diffusione?

Si potrebbe far osservare che durante la stagione estiva la temperatura del terreno supera di molto i 30° C., e che il fungo nelle sostanze vegetali riscaldate dal sole potrebbe trovare il calore necessariò per il suo sviluppo e per la sua sporificazione, ma quando si pensa che nella notte la temperatura si abbassa e che nei punti ove batte il sole non può permanere quell'umidità necessaria alla vegetazione del micelio, la quale poi verrebbe anche ostacolata dall'azione diretta dei raggi solari, si deve escludere una tale probabilità, almeno nei paesi delle zone temperate; soltanto nelle zone tropicali, ove il riscaldamento del terreno è ovunque elevato, il calore solare potrebbe avere una certa importanza nello sviluppo naturale del fungo, se le condizioni sono particolarmente speciali e tali che il terreno e i substrati organici non siano tanto asciutti e colpiti direttamente dai raggi solari.

Anche il calore animale potrebbe costituire una sorgente di temperatura relativamente elevata favorevole a questo fungo; ma finora esso non è stato mai riscontrato nelle feci, e anche se ciò fosse avvenuto, non è detto che ciò dipenda dal fatto che il fungo si sia sviluppato nel tubo digerente degli animali che hanno ingerito le spore eventualmente presenti nei cibi. Potrebbe darsi che al pari di specie bacteriche termofile che si riscontrano nelle feci degli animali a sangue caldo, uomo compreso, anche l'*Acremoniella thermophila* non trovasse le condizioni propizie per lo sviluppo nel tubo digerente.

Ma dopo le ricerche e gli isolamenti di Miehe [21] [23], Dupont [13], Rege [31] e miei [6], si può ormai asserire che questo ifomicete non manca mai nelle masse di materie vegetali soprariscaldate; e quindi, tanto nel fieno, nella paglia e nel letame, quanto nei semi e in altre so-

stanze ammucchiate e autoriscaldate, il fungo può svilupparsi e sporificare abbondantemente, per poi diffondersi con il trasporto, lo spargimento o la diffusione di questi materiali, presenti ovunque si esplica l'attività agricola e zootecnica dell'uomo.

Non quindi a speciali sorgenti di calore — solare o vitale — ma al calore dell'autoriscaldamento delle masse di vegetali in decomposizione, dobbiamo lo sviluppo e la diffusione di questo ifomicete in natura. Esso, oltre a servirsi del calore di una tale origine per la sua iniziale vegetazione, interviene nel fenomeno di decomposizione dei diversi materiali, contribuendo — entro certi limiti — all'elevamento della temperatura della massa [23]. La sua azione si esplica specialmente su i composti ternari di carbonio, possedendo, secondo il Rege [31], la gran parte degli enzimi idrolizzanti queste sostanze, eccetto la cellulosi; e per questo, nelle colture a base di cellulosa il suo sviluppo non si osserva.

Nella speciale alterazione delle cariossidi di frumento in cui io l'ho isolato, ho notato infatti che nei casi rari in cui l'ifomicete arrivava a svilupparsi anche attorno e dentro il parenchima amilifero, si osservavano talora le cellule di questo tessuto vuotate del loro contenuto, mentre conservavano la parete intatta fin tanto che non fossero intervenuti anche altri microrganismi dissolventi la cellulosa.

La diffusione di questo fungo è infine facilitata dal fatto che i conidî hanno la possibilità di rimanere vitali per lungo tempo anche a bassa temperatura; nelle colture lasciate in ambienti freddi e sempre aperti senza essere trapiantate per circa quattro mesi, durante una intera stagione invernale, il potere germinativo dei conidî non è apparso affatto menomato.

IV. — Conclusioni.

Le ricerche fatte sulla morfologia e sulla fisiologia dell'*Acremoniella thermophila*, con speciale riguardo alla variazione discontinua, si possono riassumere come segue:

La diffusione e la conservazione del fungo sono affidate unicamente ai conidî, non formandosi, nelle varie condizioni sperimentate, organi riproduttivi più evoluti o speciali organi vegetativi resistenti. Anche a bassa temperatura i conidî possono rimanere vitali per lungo tempo.

La sporificazione si ha non soltanto nelle ife aeree, ma anche nelle ife sommerse nel substrato, come pure nell'interno delle cariossidi alterate di frumento.

In tutti i casi il fenomeno dello sviluppo e della maturazione dei conidî è stato seguito e descritto con particolare attenzione.

Il rivestimento esterno dei conidî risulta costituito di sostanza mucillaginosa che forma attorno alla parete uno strato uniforme, dapprima ialino e attaccaticcio, in seguito bruno e grinzoso, assumendo un aspetto reticolato con il disseccamento e l'adattamento alla parete del conidio, la quale rimane sempre liscia e uniforme. Tale involucro presenta le reazioni delle sostanze pectiche come le presentano altri rivestimenti simili riscontrati nelle spore di alcuni funghi superiori.

Il micelio, nei terreni ben provvisti di principi nutritivi, presenta sovente delle cellule più o meno ingrossate e differenziate, ripiene di protoplasma e fornite di parete sottile, funzionanti da piccoli magazzini di riserva e di conservazione del protoplasma, per le quali viene proposto il nome di *cellarioli* (*cellariolum*) e di *ificellarioli* (*hyphicellariola*) a una serie continua di tali cellule.

Vengono invece chiamate *oidalee* le cellule miceliche eccessivamente rigonfie per il processo della plasmoptisi o comunque ingrossate e aventi la parete sottile e l'interno occupato generalmente da grandi vacuoli.

I caratteri morfologici corrispondono al genere *Acremoniella* Sacc. e non ad altri generi di ifomiceti, come era stato riferito da alcuni autori. Il nome specifico di *Acremoniella thermophila* Curzi è il più esatto, e oltre a indicare la migliore posizione sistematica della specie e la sua principale proprietà biologica, evita ogni causa di confusione con l'*Acremonium* (*Thermomyces*) *lanuginosus* (Tsil.) n. c., al quale il fungo era stato erroneamente riferito.

Tutti i caratteri del fungo variano sensibilmente ad eccezione delle dimensioni e della forma dei conidî, le quali rimangono pressochè costanti nelle varie condizioni sperimentate.

Sul medesimo substrato culturale e nell'eguaglianza perfetta di tutti gli altri fattori ambientali questo fungo, per selezione conidiale e per variazioni settoriali, può dare luogo a un numero elevato di colonie corrispondenti a diversi stipiti della specie.

Di tutte le variazioni presentate vengono seguite quelle non direttamente condizionate da fattori esterni, e che si manifestano nelle colonie del fungo, non come variazioni graduali e continue, ma come variazioni brusche e discontinue, delle quali alcune appaiono a macchie indefinite, irregolari, che risaltano per lo sviluppo e per l'aspetto, nel micelio aereo e nel velo delle colture cloniali; altre a settori più o meno differenziati nella quantità del micelio aereo, nella sporificazione, nel colore, nell'accrescimento e in altri caratteri minori.

Un nuovo tipo di variazione (*a salti alternanti*), nella quale due colonie a caratteri opposti compaiono alterna-

tivamente di generazione in generazione, viene riscontrato e descritto in questo fungo. Nel fenomeno si possono distinguere tre casi diversi a seconda che la variazione si presenta regolare e completa, oppure che venga turbata dalla comparsa di settori rappresentanti nuove serie di variazioni identiche o stipiti non reversibili, aventi le principali caratteristiche delle due colonie.

Da una colonia derivata da varî trapianti di una coltura cloniale vengono separati e descritti cinque stipiti, indicati con α, β, γ, δ e ε corrispondenti a tanti settori differenti. Di questi stipiti, gli intermedî, i quali hanno minore quantità di micelio aereo, sono i più stabili, mentre gli estremi (α e ε), più ricchi di micelio aereo, sono i meno stabili e quelli che presentano facilmente i settori con una diminuzione molto variabile di micelio aereo, di sporificazione e di intensità di colorazione.

Dal primo si possono separare varî stipiti che formano una scala decrescente di valori culturali; dall'ultimo invece sono stati separati tre stipiti non in serie, segnanti le traccie di due successioni diverse convergenti negli stipiti inferiori.

Quando uno stipite inferiore di una serie di variazione manifesta qualche settore di ritorno in uno stipite superiore, dal confronto della coltura di quest'ultimo con quella ottenuta dal settore, si osservano quasi sempre delle diversità che persistono nei successivi trapianti.

Le reversioni osservate, eccetto qualche caso molto discutibile, non sono mai complete, ma sempre approssimative; e ciò dimostra che i settori di stipiti puri che compaiono nelle colture cloniali di questo ifomicete, non sono dovute a combinazioni e a scomposizioni di stipiti diversi ma a una forza insita nel protoplasma che spinge la cellula vegetativa a variare in un senso o nell'altro, indipendentemente da qualsiasi impurezza genetica.

Lo stesso stipite che nelle colture, per le quali si è ricorso sempre al trapianto di una colonia conservata a

35° C., aveva dato il suo massimo a 54° C., nelle colture con trapianti di colonie ottenute a temperature progressivamente crescenti, si sviluppava anche alla temperatura oscillante di 68°-70° C.

Il limite massimo di sviluppo si confonde con quello di resistenza del plasma del fungo al calore. Il micelio muore dopo 24 ore alla temperatura costante di 70° C., e alla temperatura oscillante di 70°-72° C.

La coltura sviluppatasi a 65°-70° C., riportata nei termini biologici inferiori di calore si conserva diversa da quella originale e caratterizza uno stipite speciale, (T), morfologicamente e fisiologicamente ben distinto. Nelle soluzioni di peptone con alcuni carboidrati questo stipite presenta nelle ife miceliche abbondanti incrostazioni di natura identica al rivestimento dei conidî, che mancano nello stipite originale.

Lo stesso stipite T si può ottenere per selezione termica da più stipiti differenti del fungo; esso quindi non si può considerare come una fase di un determinato stipite, ma piuttosto come una variazione brusca del plasma vegetativo che potrebbe indifferentemente prodursi in qualsiasi ceppo del fungo.

*
* *

Nel chiudere il presente lavoro sento il dovere di esprimere vivissimi sentimenti di gratitudine al direttore di questa Stazione, Prof. L. Petri, che mi ha seguito e consigliato nelle ricerche, e che oltre a mettere a mia disposizione ogni mezzo di indagine si è interessato perchè la R. Accademia Nazionale dei Lincei concedesse alle mie ricerche sperimentali sulla variabilità dei funghi un premio d'incoraggiamento.

Roma - R. Stazione di Patologia Vegetale.
Luglio 1930 - VIII.

BIBLIOGRAFIA CITATA

1. Bergey D. H., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; sec. edit, Baltimore 1925.
2. Brierley W. B., *Variation in Fungi and Bacteria*. « Proced. of the Internat. Congress of Plant Sciences »; v. II, pp. 1629-1654, 1929.
3. Chodat F., *Recherches expérimentales sur la mutation chez les champignons*, « Bull. Soc. Bot. de Genève »; Ser. 2, v. 18, pp. 41-144, Pl. I-XIII, 1926.
4. Cohn F., *Ueber die Algen des Karlsbader Sprudels und deren Anteil an der Bildung des Sprudelsinters*, « Flora »; B. 45, p. 538, 1862; vgl. auch. 40. « Jahresber. d. Schles. Gesellsch, f. vaterl. Kultur », p. 65.
5. Curzi M., *Intorno alla posizione sistematica di un* Fusarium *isolato dalla pelle del cane*, « Atti Ist. Bot. R. Univ. Pavia »; vol. I, ser. IV, pp. 95-105, 2 fig., 1929.
6. — *Su una « pseudo-carie » delle cariossidi di frumento*, « Rend. R. Accad. Naz. dei Lincei, cl. Sc. Fis. Mat. e Nat. »; vol. X, ser. 2.ª, 2.° sem., fasc. 3-4, pp. 224-226, 1929. « Atti Ist. Bot. R. Univ. Pavia »; vol. I, ser. IV, pp. 151-155, 2 fig., 1929.
7. — *Prime osservazioni su la mutazione di un ifomicete*, « Rend. R. Accad. Naz. dei Lincei, cl. Sc. Fis. Mat. e Nat. »; vol. XI, ser. 6.ª, 1.° sem, fasc. 5, pp. 506-508, marzo 1930, « Atti secon. Congr. Naz. Microbiologia »; pp. 49-52, Milano 1930.
8. Dallinger W. H., *The presidents adress* (*9th February 1887*). « Journal of the Royal Mikroscopical Society », p. 185, 1887.
9. Davemport C. B. and Castle W. E., *Studies in Morphogenesis III. On the acclimatization of organisms to high temperatures*, « Archiv. f. Entwieklungsmechanik der Organismen »; Bd. 2, p. 227, 1895.
10. Dieudonné A., *Neuere Beiträge zur Kenntnis der Biologie der Bakterien*, « Biolog. Centralbl. »; Bd. 15, p. 103, 1895.

11. Georgevitch P., *Bacillus thermophilus Jivoïni nov. spec. und Bacillus thermophilus Losanitchi nov. spec.* « Centralblatt f. Bakteriologie »; Abt. II, Bd. XXVII, pp. 150-167, 1 taf., 1910.
12. Globig., *Ueber Bakterienwachstum bei 50-70°,* « Zeitsch. f. Hygiene »; Bd. 3, p. 294, 1887.
13. Griffon E. et Maublanc A., *Deux Moissisures thermophiles,* « Bull. Soc. Mycol. France »; Tom. XXVII, pp. 68-74, 1911.
14. Fischer A., *Vorlesungen über Bakterien.* Jena, 1897.
15. Hoppe-Seyler, *Ueber die obere Temperaturgrenze des Lebens.* « Pflüger's Archiv. »; Bd. XI, p. 113-121, 1875.
16. Horne A. S. and Das Gupta S. N., *Studies in the Genera Cytosporina, Phomopsis and Diaporthe I. On the Occurrence of an « Ever-saltating » Strain in Diaporthe.* « Ann. of Botany »; v. XLIII, p. 417-435, 7 fig., 1929.
17. Jourde A., *Etude de quelques moisissures thermophiles.* « Thèse de doctorat en Pharmacie », Lons-le-Saunier, 1908.
18. Löwenstein A., *Über die Temperaturgrenzen des Lebens bei der Thermalalge Mastigocladus laminosus Cohn,* « Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. »; Bd. 21, p. 317, 1903.
19. Mac Fadyen A. and Blaxall F. R., *Thermophilic bacteria,* « Transact. of the Instit. of prevent. medic. London »; Ser. 2, p. 185, 1899.
20. Michaelis G., *Beiträge zur Kenntnis der thermophilen Bakterien,* « Archv. fr. Hygiene »; Bd. 36, p. 285, 1899.
21. Miehe H., *Die Selbsterhitzung des Heus.* Gustav Fischer, Jena, 1907.
22. — *Thermoïdium sulfureum n. g., n. sp., ein neuer Wärmepilz,* « Ber. Deutsch. Bot. Ges. »; Bd. XXV, pp. 510-515, 6 figs., 1907.
23. — *Die Wärmebildung von Reinkulturen un Hinblick auf die Ätiologie der Selbsterhitzung pflanzlicher Stoffe,* « Arch. f. Mikrobiologie »; Bd. I, Heft 1, pp. 78-118, Berlin 1930.
24. Miquel, *Bulletin de la Statistique municipale de la ville de Paris, decembr. 1879,* « Annuaire de l'Observatoire de Montsouris pour 1881 », p. 464.
25. Münch E., *Ueber Krankhafte Kernbildung,* « Naturwiss. Zeitschr. für Forst-nuol Landwirtschaft. »; 8 jahr., Heft 12., pp. 551-569 (p. 558) 1910.
26. Petri L., *Osservazioni sopra lo « Scleroderma Ambiguum »*

Petri e le sue affinità sistematiche, « Mem. R. Accad. Lincei », cl. Sc. Fis., Mat. e Nat., ser. sesta, vol. III, fasc. III, pp. 77-82, 1 tav. col., 1928.

27. — *Studi sulle malattie dell'olivo.* III. *Alcune ricerche sulla biologia del Cycloconium oleaginum* Cast., « Mem. R. Staz. Pat. Veg. », Roma, pp. 1-136, (p. 27), 37 fig. 1913.
28. — *Le variazioni a salti « Saltations » dei microrganismi e il loro significato biologico.* « Atti II Congr. Naz. Microbiologico »; pp. 13-48, Milano, Marzo 1930.
29. Pollacci G., *Miceti del corpo umano e degli animali* (Nota terza). « Rivista di Biologia »; v. V, pp. 358-367, 3 fig., 1923.
30. Rabinowitsch L., *Ueber die thermophilen Bakterien,* « Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrankh »; Bd. 20, p. 160, 1895.
31. Rege R. D., *Biochemical decomposition of cellulosie materials with special reference to the Action of fungi,* « Ann. Appl. Biol. »; v. XIV, pp. 1-44, 4 pl., 1927.
32. Saccardo P. A., *Sylloge Fungorum*; vol. XVIII, p. 524, Patavii 1906.
33. Sames Th., *Zur Kenntnis der bei höherer Temperatur wachsenden Bakterien und Streptothrixarten.* « Zeitschr. f. Hygiene », Bd. 33, p. 313, 1900.
34. Schardinger F., *Ueber thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch ausw,* « Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs-und Genubmittel »; Bd. 6, p. 865, 1903.
35. Schillinger, *Über thermophile Bakterien* « Hygien Rundschau »; p. 568, 1898.
36. Thom Ch., *The Penicillia. Chapt XXIV,* (*Paecilomyces*); pp. 541-551, London 1930.
37. Tsiklinsky P., *Les microbes thermophiles des sources thermales,* « Ann. Institt. Pasteur »; Bd. 13, p. 788, 1899.
38. — *Sur les Mucédinées thermophiles,* « Annales de l'Instit. Pasteur »; v. XIII, p. 500, 1899.
39. — *Sur la flore microbienne thermophile du canal intestinale de l'homme,* « Annal. de l'Istit. Past. »; Bd. 13, p. 216, 1903.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE (1)

Tavola III.

Fig. 1. — Coltura di *Acremoniella thermophila,* derivata da un trapianto di una colonia monosporogenita, dopo 20 giorni su agar infuso di cariossidi di grano glucosato (2 %) alla temperatura ambiente di 38° C., con diverse variazioni settoriali corrispondenti agli stipiti α, β, γ, δ, e ε (4/7 grand. nat.).

Fig. 2. — Colonia dello stipite α con tre settori di variazione (4/7 grandezza naturale).

Fig. 3. — Idem con diversi settori i quali presentano anche alcune macchie scure di variazioni fluttuanti (4/7 grand. natur.).

Tavola IV.

Fig. 1-2. — Colonie dello stipite α_5 diversamente zonate (4/7 grand. naturale).

Fig. 3. — Colonia dello stipite α_{5a} con diversi settori di ritorno allo stipite α_5 (4/7 grand. nat.).

Fig. 4. — Colonia dello stipite β (4/7 grand. nat.).

Tavola V.

Fig. 1. — Colonia dello stipite δ (4/7 grand. nat.).

Fig. 2. — » » » γ (» »).

Fig. 3. — » » » ε (» »).

Fig. 4. — » » » ε_4 con un settore di variazione sopraffatto dal micelio più vigoroso dello stipite (4/7 grand. nat.).

Tavola VI.

Fig. 1. — Colonia dello stipite ε_{1a} (4/7 grand. nat.).

Fig. 2. — » » » ε_{1aI} (» »).

Fig. 3. — Colonie dello stipite β e dello stipite T, derivato dal primo per selezione termica, dopo 10 giorni di sviluppo su agar infuso di fagioli glucosato (2 %) alla temperatura ambiente di 35° C. (5/7 grand. nat.).

(1) Ad eccezione della figura 1 della tavola III e della figura 3 della tavola IV, tutte le figure delle quattro tavole riguardano colture su agar sintetico C dopo sei giorni di sviluppo in termostato « Weber » alla temperatura oscillante di 38°-40° C.

L'Aut. fot. CURZI M. – Acremoniella thermophila.

DANESI – ROMA

L'Aut. fot. CURZI M. – Acremoniella thermophila.

DANESI – ROMA

L'Aut. fot.

CURZI M. – Acremoniella thermophila.

DANESI – ROMA

L'Aut. fot. CURZI M. – Acremoniella thermophila.

DANESI - ROMA